

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

w Szczecinie

Wydział Medycyny i Stomatologii



mgr Natalie Grzesch

**Analiza związku polimorfizmu genu interleukiny 6 i genu receptora
interleukiny 6 z predyspozycją do bliznowca**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej Ciechanowicz

Szczecin 2023 r.

Szczecin, dnia 20.02.2023 r.

OŚWIADCZENIE

autora o samodzielnym napisaniu rozprawy doktorskiej

Ja, niżej podpisana *Natalie Grzesch* uczestniczka Studiów Doktoranckich w Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie niniejszym przedkładam moją rozprawę doktorską pt.: „*Analiza związku polimorfizmu genu interleukiny 6 i genu receptora interleukiny 6 z predyspozycją do bliznowca*” oraz oświadczam, że przedkładaną rozprawę doktorską napisałam samodzielnie. Oznacza to, że przy pisaniu pracy poza niezbędnymi konsultacjami nie korzystałam z pomocy innych osób, a w szczególności nie zleciłam opracowania rozprawy lub jej części innym osobom, ani nie odpisałam tej rozprawy lub jej części z innych źródeł. Ponadto cytaty z obcych prac zostały wyczerpująco oznaczone oraz wskazane w przypisach i bibliografii mojej pracy. Przedkładana rozprawa nie narusza przepisów ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tekst jednolity z dnia 17 maja 2006 r. Dz. U. nr 90, poz. 631) również w inny sposób.

podpis

*Składam serdeczne podziękowania Promotorowi,
Panu prof. dr hab. n. med. Andrzejowi Ciechanowiczowi
za cierpliwość, opiekę merytoryczną
i wsparcie podczas prowadzenia badań naukowych.*

Mojej Mamie
Serdecznie dziękuję
za nieocenione wsparcie, ciepło
i motywację w realizacji zawodowej.

Spis treści

STOSOWANE SYMBOLE I SKRÓTY.....	5
SPIS RYCIN	6
SPIS TABEL.....	7
1. Wstęp.....	8
1.1. Patogeneza keloidu	9
1.2. Czynniki genetyczne w patogenezie bliznowca.....	11
2. Cel pracy	18
3. Materiał i metody	19
3.1 Pacjenci z bliznowcem.....	19
3.2. Grupa kontrolna	19
3.3. Metodyka badań molekularnych.....	19
3.4. Analiza statystyczna.....	24
4. Wyniki.....	25
5. Dyskusja.....	34
6. Wnioski	45
7. Streszczenie.....	46
8. Abstract	48
9. Piśmiennictwo.....	50

STOSOWANE SYMBOLE I SKRÓTY

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)

ECM - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)

GAG - glikozaminoglikany (ang. Glycosaminoglycans)

gp130 - glikoproteina o masie cząsteczkowej 130 kDa (ang. glycoprotein 130)

GWAS - badania asocjacyjne całego genomu (ang. Genome-Wide Association Study)

IL-6 - interleukina 6 (ang. interleukin-6)

IL-6R - receptor dla interleukiny 6 (ang. interleukin-6 receptor)

IUGR - wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (ang. intrauterine growth retardation)

LD - nierównowaga sprzężeń (ang. linkage disequilibrium)

LPS - lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)

pz - para zasad (ang. base pair, bp)

sIL6R - rozpuszczalny receptor dla interleukiny 6 (ang. soluble human IL-6 receptor)

TGF- β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. transforming growth factor β)

SPIS RYCIN

Rycina 1. Identyfikacja polimorfizmu rs1800797 genu *IL6* (-597G>A) metodą PCR-RFLP

Rycina 2. Identyfikacja polimorfizmu rs1800796 genu *IL6* (-572G>C) metodą PCR-RFLP

Rycina 3. Identyfikacja polimorfizmu rs1800795 genu *IL6* (-174G>C) metodą PCR-RFLP

Rycina 4. Chromatogramy sekwencyjne dla rs1800796 genu *IL6* (-572G>C)

Rycina 5. Chromatogram sekwencyjny dla rs2228145 *IL6R*

SPIS TABEL

Tabela 1. *Loci* chromosomalne sprzężone z bliźnowcem

Tabela 2. Polimorfizmy genetyczne predyspozycji do bliźnowca zidentyfikowane w badaniach asocjacyjnych całego genomu (GWAS)

Tabela 3a. Analiza związku polimorfizmów genów kandydatów z podatnością do bliźnowca, część 1.

Tabela 3b. Analiza związku polimorfizmów genów kandydatów z podatnością do bliźnowca, część 2.

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna pacjentów z bliźnowcem (n=86).

Tabela 5. Analiza rozpowszechnienia alleli i genotypów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* oraz rs2228145 genu *IL6R* w pacjentów z bliźnowcem i w grupie kontrolnej.

Tabela 6. Analiza sprzężeń polimorfizmów genu *IL6*.

Tabela 7. Haplotypy *IL6* w całej badanej grupie oraz w grupie pacjentów z bliźnowcem i w grupie kontrolnej.

Tabela 8. Haplotypy *IL6* u pacjentów z bliźnowcem i w grupie kontrolnej.

1. Wstęp

Bliznowiec (ang. keloid) jest łagodnym, miejscowo agresywnym, fibroproliferacyjnym przerostem blizny, klasyfikowanym jako łagodny nowotwór skóry, przekraczającym jej granicę z zajęciem zdrowej skóry. W przeciwieństwie do blizn przerostowych, które z reguły nie przerastają granic blizny i wykazują tendencję do samoistnego ustępowania, bliznowiec może przerastać jej granice, a samoistne cofanie się zmian jest obserwowane rzadko [1].

Pierwszy opis bliznowca (lub blizny przerostowej) zawarty został w tzw. papirusie Smith`a sprzed ok. 3600-3700 lat. Jak twierdzi David Isaacs w 1862 roku Amerykanin Edwin Smith zakupił ten starożytny papirus w Luksorze od pewnego handlarza o imieniu Mustafa. W 1930 roku papirus trafił do Nowojorskiego Towarzystwa Historycznego, które zleciło jego tłumaczenie. Okazało się wtedy, że papirus Smitha jest najstarszym znanym ludzkości traktatem chirurgicznym. Przypuszcza się, że traktat ten jest prawdopodobnie plagiatem o tysiąc lat starszego dzieła przypisywanego Imhotepowi, wielkiemu lekarzowi staroegipskiemu [2]. Autor traktatu z dokładnością kliniczną bliską medycynie współczesnej opisał przypadki 48 pacjentów, prawdopodobnie żołnierzy, z różnego typu ranami, urazami, złamaniami i guzami. Przypadek 45 dotyczy mężczyzny z wypukłymi guzami na piersi, które są „bardzo chłodne, nie ma w nich żadnej gorączki, gdy dotyka je ręka; nie mają ziarnistości, nie tworzą płynu, nie wytwarzają wydzieliny i wybrzuszą się”. Autor opisu wspomina również o „występowaniu na piersi dużych zgrubień rozprzestrzeniających się i twardych; dotykane ich jest jak dotykane pomarszczonego kulistego owocu, który jest twardy i chłodny” [3]. Keloid, nazwa bliznowca w języku angielskim, choć niekiedy stosowana również w języku polskim, pochodzi od terminu *cheloide* będącego złożeniem dwóch greckich słów: *chele* (szczypce kraba) i *oid* (podobny). Termin

cheloide po raz pierwszy został zastosowany w 1790 roku przez francuskiego lekarza Noëla Retza, a opisany w 1816 roku przez Jeana Louisa Aliberta [4-6].

1.1. Patogeneza keloidu

Jak dotąd etiologia bliznowców i patomechanizm ich powstawania nie zostały do końca poznane [7]. Wskazuje się, że formowanie bliznowca jest złożonym procesem zależnym od wielu czynników, a wśród czynników ryzyka jego powstania wymienia się m.in. zakażenie rany, stan napięcia skóry, rasę, zaburzenia czynności układu immunologicznego oraz podatność genetyczną. Bliznowiec może występować zarówno u kobiet, jak i mężczyzn, a grupę podwyższonego ryzyka jego pojawienia się stanowią ciężarne oraz nastolatki i tzw. młodzi dorośli. Występowanie bliznowca dotyczy również wszystkich głównych grup etnicznych, najczęściej jednak jest on stwierdzany u osób pochodzących z Afryki lub których przodkowie pochodzili z Afryki (np. u Afro-Amerykanów) oraz osób pochodzących z Azji [1,8-12]. U osób z ciemnym zabarwieniem skóry bliznowiec jest wykrywany ok. 4–16-krotnie częściej niż u przedstawicieli rasy kaukaskiej [1,9,10,13,14]. Należy też podkreślić, że nie potwierdzono, jak dotąd, przypadków bliznowca u albinosów [15].

Macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix, ECM) odgrywa istotną rolę w fizjologii skóry oraz w procesie jej regeneracji. Kluczowymi komórkami tkanki bliznowatej są fibroblasty, odpowiedzialne za syntezę kolagenu. Do tworzenia się bliznowca prowadzi zaburzenie (wydłużenie) fazy fibroblastycznej procesu prawidłowego gojenia się ran [16]. Wydłużenie tej drugiej fazy procesu gojenia zaburza równowagę pomiędzy wytwarzaniem, rozpadem i przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej. Procesy te charakteryzują się zmniejszeniem proliferacji komórek i nasileniem apoptozy komórek śródbłonna, miofibroblastów i makrofagów oraz zastępowaniem kolagenu typu III przez kolagen typu I a glikozaminoglikanów

(GAG) przez proteoglikany [17]. Andrews zwrócił uwagę, że formujący się bliznowiec charakteryzuje się zwłóknieniem spowodowanym nadmiarem macierzy zewnątrzkomórkowej oraz nieprawidłową proliferacją fibroblastów obecnych w tej zmianie (tzw. fibroblasty „keloidowe”) [18]. W porównaniu do prawidłowych fibroblastów, fibroblasty „keloidowe” wykazują ponad czterokrotnie większe nasilenie syntezy fibronektyny i ok. 20-krotne zwiększenie syntezy kolagenu, a także zwiększenie stężenia izoformy beta-1 (TGF- β 1) i izoformy beta-2 (TGF- β 2) transformującego czynnika wzrostu (ang. Transforming Growth Factor) [19-21].

Oprócz pobudzenia szlaku TGF- β /SMADs [22-26] istotną rolę w patogenezie bliznowca odgrywa także nadmierna aktywacja transdukcji sygnału zależnego od interleukiny 6 [19]. Interleukina 6 (IL6) jest bowiem jedną z głównych cytokin biorących udział w odpowiedzi immunologicznej na uraz skóry [27]. W transdukcji sygnału interleukiny 6 do wnętrza komórki niezbędny jest udział dwóch cząsteczek tj. podjednostki α (podjednostka wiążąca ligand) o masie 80 kDa będącej właściwym receptorem dla tej cytokiny (IL6R) i podjednostki β (podjednostka transdukcji sygnału) będącej glikoproteiną o masie 130 kDa (gp130). Ligand jakim jest interleukina 6 najpierw łączy się z IL6R i dopiero po związaniu z nim łączy się z gp130, tworząc stabilny kompleks, który po homodimeryzacji staje się zdolny do przekazywania sygnału [28-29]. W roku 2005 Tosa i wsp. odkryli, że ekspresja IL6 (zarówno jako mRNA, jak i białka) w fibroblastach pochodzących z bliznowców jest większa w porównaniu do jej ekspresji w prawidłowych fibroblastach skóry [30]. Zwiększenie wytwarzania IL6 przez fibroblasty zostało również powiązane z nadmiernym zwłóknieniem występującym w takich chorobach, jak m.in. twardzina skóry, reumatoidalne zapalenie stawów lub zwłóknienie śródmiąższowe płuc [31-33].

1.2. Czynniki genetyczne w patogenezie bliznowca

Liczne dowody wskazują, że w patogenezie bliznowca istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne. Oprócz wspomnianego powyżej zróżnicowanego rozpowszechnienia choroby w poszczególnych grupach etnicznych [35], najważniejsze z dowodów wskazujących na genetyczną podatność do tworzenia się bliznowca to: rodzinne występowanie tych zmian i identyfikacja *loci* chromosomalnych sprzężonych z bliznowcem w niektórych rodzinach (tabela 1) oraz identyfikacja polimorfizmów genetycznych predysponujących do rozwoju bliznowca w badaniach asocjacyjnych całego genomu (GWAS, Genome-Wide Association Studies) (tabela 2) lub w badaniach asocjacyjnych zogniskowanych na poszczególnych genach kandydatach (ang. candidate genes) (tabela 3a i 3b). Dodatkowymi argumentami potwierdzającymi rolę czynników dziedzicznych w patogenezie tej choroby jest: większa niż w populacji ogólnej częstość niektórych alleli genów układu HLA u osób dotkniętych bliznowcem [36-40] oraz częstsze niż w populacji ogólnej występowanie bliznowca w niektórych chorobach jednogenowych (monogenowych) m.in. w zespole Ehlersa-Danlosa [1,41-43], zespole Goeminne [41,44], zespole Rubinsteina-Taybiego [41,45] oraz w zespole Touraine'a-Solente'a-Gole'a [46].

Tabela 1. *Loci* chromosomalne sprzężone z bliznowcem

<i>Locus</i>	Gen	Populacja/grupa etniczna	Piśmiennictwo
2q23	<i>TNFAIP6</i>	Japończycy	[47]
7p11	<i>EGFR</i>	Afro-Amerykanie	[47]
7p11	-	Chińczycy	[48]
10q23.31	-	Chińczycy	[49]
15q22.31-q23	-	Chińczycy	[50]
18q21.1	<i>PIAS2</i>	Chińczycy	[50]
	<i>SMAD2</i>		
	<i>SMAD4</i>		
	<i>SMAD7</i>		

Tabela 2. Polimorfizmy genetyczne predyspozycji do bliźnowca zidentyfikowane w badaniach asocjacyjnych całego genomu (GWAS)

Polimorfizm (pozycja)	Gen	Populacja/grupa etniczna	Piśmiennictwo
rs192314256 (1:201468602)	<i>PHLDA3</i>	Europejczycy, Azjaci	[51]
		Azjaci	[52]
rs10863683 (1:222077747)	<i>LINC01705</i>	Azjaci	[52]
rs11293015 (1:222094101)	<i>LINC01705,</i> <i>QRSLIP2</i>	Europejczycy, Azjaci	[51]
rs873549 (1:222098425)	<i>LINC01705</i>	Azjaci	[53]
rs2378519 (1:222100526)	<i>LINC01705</i>	Azjaci	[52]
rs74983791 (2:240345715)	<i>U3, GPC1</i>	Europejczycy, Azjaci	[51]
rs1511412 (3:138994862)	<i>PRR23A, FOXL2NB</i>	Azjaci	[53]
rs646315 (3:139123862)	<i>BPESCI, MRPS22</i>	Europejczycy, Azjaci	[51]
		Azjaci	[52]
rs11130248 (3:50314769)	<i>HYAL1, HYAL2</i>	Azjaci	[53]
rs183178644 (6:656415)	<i>HUS1B</i>	Azjaci	[54]
rs181924090 (11:218874)	<i>SIRT3</i>	Azjaci	[54]
rs16976600 (15:55862437)	<i>NEDD4</i>	Europejczycy, Azjaci	[51]
		Azjaci	[52]
rs8032158 (15:55902679)	<i>NEDD4</i>	Azjaci	[53]
rs151091483 (17:10409361)	<i>MYH8</i>	Azjaci	[54]

Tabela 3a. Analiza związku polimorfizmów genów kandydatów z podatnością do bliznowca, część 1

Polimorfizm (pozycja)	Gen	Populacja/grupa etniczna	Asocjacja (tak/nie)	Piśmiennictwo
rs2228145 (1:154454494)	<i>IL6R</i>	Japończycy	Nie	[55]
rs873549 (1:222098425)	<i>LINC01705, QRSL1P2</i>	Chińczycy	Tak	[56]
		Chińczycy	Tak	[57]
rs1442440 (1:222066192)	<i>LINC01705, QRSL1P2</i>	Chińczycy	Tak	[56]
rs12629284 (3:139252188)	?	Chińczycy	Nie	[56]
rs940187 (3:139122751)	<i>FOXL2</i>	Chińczycy	Nie	[56]
		Japończycy	Tak	[53]
rs1511412 (3:138994862)	<i>FOXL2</i>	Chińczycy	Nie	[56]
		Chińczycy	nie	[57]
		Japończycy	tak	[53]
rs1800796 (7:22726627)	<i>IL6</i>	Japończycy	Tak	[55]
		Chińczycy	tak	[27]
		Egipcjanie	tak	[58]
rs1800795 (7:22727026)	<i>IL6</i>	Chińczycy	Nie	[27]
rs140447165 (15:59205423)	<i>MYO1E</i>	Afro-Amerykanie	Nie	[59]
rs28383563 (15:59124864)	<i>CCNB2</i>	Afro-Amerykanie	Tak	[59]

Tabela 3b. Analiza związku polimorfizmów genów kandydatów z podatnością do bliznowca, część 2

Polimorfizm (pozycja)	Gen	Populacja/grupa etniczna	Asocjacja (tak/nie)	Piśmiennictwo
rs139614046 (15:59618689)	<i>GCNT3</i>	Afro-Amerykanie	Tak	[59]
rs141152343 (15:59679624)	<i>BNIP2</i>	Afro-Amerykanie	Tak	[59]
rs2271289 (15:55924595)	<i>NEDD4</i>	Chińczycy	Tak	[56]
		Chińczycy	Tak	[57]
rs2118610 (15:67135996)	<i>NEDD4</i>	Chińczycy	Nie	[57]
rs1042522 (17:7676154)	<i>TP53</i>	Chińczycy	Nie	[60]
		Polacy	nie	[61]
rs17878362 (17:7675967- 17:7675982)	<i>TP53</i>	Polacy	Nie	[61]
rs75667697 (18:51058143)	<i>SMAD4</i>	Malajowie	Nie	[62]
rs1245628	<i>SMAD4</i>	Malajowie	tak	[62]
rs1800469 (19:41354391)	<i>TGFBI</i>	Malajowie	tak	[62]
rs1800470 (19:41353016)	<i>TGFBI</i>	Malajowie	tak	[62]

W świetle istotnej roli, jaką w patogenezie bliznowca odgrywa, opisana w poprzednim podrozdziale, nadmierna aktywność szlaku sygnalizacyjnego interleukiny 6, intrygująco prezentują się wyniki prac zogniskowanych na ocenie związku pomiędzy czynnościowymi polimorfizmami genów kodujących interleukinę 6 i jej receptor.

Położony na chromosomie 7p21 gen *IL6* koduje interleukinę 6, a w najbardziej proksymalnej części jego promotora (region -600 do -1 od miejsca inicjacji translacji) zidentyfikowano trzy polimorfizmy pojedynczych nukleotydów tj. rs1800797 (-597G>A), rs1800796 (-572G>C) i rs1800795 (-174G>C). W 2003 r. Rivera-Chavez i wsp. analizowali związek tych polimorfizmów *IL6* z wytwarzaniem tej cytokiny przez leukocyty stymulowane lipopolisacharydem (LPS), a także wiązanie białek jądrowych z syntetycznymi oligonukleotydami obejmującymi polimorfizm rs1800795. Wyniki tych doświadczeń ujawniły, że wytwarzanie *ex vivo* interleukiny 6 było największe u „podwójnych” homozygot GG (homozygota GG dla polimorfizmu rs1800797 i homozygota GG dla rs1800795). Z kolei, u osób, które były homozygotami AA dla rs1800797 i homozygotami CC dla rs1800795, produkcja IL6 była najmniejsza. Wykazano także, że powinowactwo białek jądrowych do oligonukleotydów zawierających guaninę w pozycji -174 było większe niż do oligonukleotydów z cytozyną w pozycji -174 [63].

Gen *IL6R* zlokalizowany na chromosomie 1q21.3 koduje zlokalizowany w błonie komórek receptor dla interleukiny 6 (gp80). Polimorfizm rs2228145 genu *IL6R* jest transwersją adeniny na cytozynę nukleotydu w pozycji 1073 tego genu (c.1073A>C). Następstwem tej mutacji jest zastąpienie kwasu asparaginowego przez alaninę w pozycji 358 łańcucha polipeptydowego receptora dla IL6 (p.Asp358Ala). Aminokwas w pozycji 358 *IL6R* znajduje się w miejscu cięcia tego białka przez metaloproteazy ADAM10 i ADAM17. Produktem reakcji katalizowanej przez te proteazy jest wydzielana do krążenia biologicznie aktywna domena zewnątrzkomórkowa receptora (s*IL6R*, soluble *IL6R* tj. rozpuszczalna forma receptora IL6). Rozpuszczalna forma *IL6R* może wiązać się z wolną interleukiną 6

obecną w krwi i w innych płynach ustrojowych tworząc biologicznie aktywny kompleks [64,65]. Tworzenie tego kompleksu wzmacnia działanie interleukiny 6 wydłużając jej okres półtrwania z minut do godzin i umożliwiając w ten sposób dotarcie sygnału IL6 do miejsc odległych od komórek przejawiających ekspresję błonowej formy IL6R [64,66]. W kilku badaniach niezależnie od siebie potwierdzono, że allel p.358Ala jest związany z zwiększonym stężeniem sIL6R w surowicy [67-70].

W 2016 roku Tosa i wsp. analizując polimorfizmy rs1800797, rs1800796 i rs1800795 *IL6* oraz rs2228145 *IL6R* u Japończyków stwierdzili istotnie większą częstość allela -572G polimorfizmu rs1800796 *IL6* u pacjentów z bliznowcem w porównaniu do zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Dla dwóch pozostałych polimorfizmów promotora *IL6* wszystkie zbadane osoby miały homozygotyczny genotyp typu dzikiego tj. GG. Z kolei, dla polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* autorzy ci wykazali brak istotnych różnic w rozkładzie jego genotypów i alleli pomiędzy chorymi z bliznowcem i osobami stanowiącymi grupę kontrolną [55]. Rok później Zhu i wsp., którzy analizowali tylko polimorfizmy rs1800796 i rs1800795 *IL6*, wykazali, że również u Chińczyków allel -572G (polimorfizm rs1800796) był związany z predyspozycją do bliznowca, a także, iż u pacjentów z bliznowcem stężenie interleukiny 6 w surowicy u homozygot GG było istotnie większe w porównaniu do osób z homozygotycznym genotypem CC [27].

Powyższe obserwacje dotyczące związków allela G polimorfizmu rs1800796 *IL6* z predyspozycją do bliznowca i ze stężeniem interleukiny w surowicy zostały w 2019 roku potwierdzone w badaniach przeprowadzonych w niewielkiej liczbie grupie Egipcjan (60 chorych z bliznowcem i 30 zdrowych mieszkańców Egiptu stanowiących grupę kontrolną) [58].

2. Cel pracy

Na podstawie powyższych przesłanek sformułowano cel rozprawy, jakim była ocena związku polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 promotora genu *IL6* kodującego interleukinę 6 i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* kodującego receptor dla interleukiny 6 z predyspozycją do bliznowca u Polaków.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Ocenę związku analizowanych pojedynczo polimorfizmów: rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* oraz z predyspozycją do bliznowca.
2. Analizę nierównowagi sprzężenia pomiędzy poszczególnymi parami polimorfizmów promotora *IL6* (tj. rs1800797 i rs1800796, rs1800797 i rs1800795 oraz rs1800796 i rs1800795).
3. Rekonstrukcję haplotypów utworzonych przez 3 polimorfizmy promotora *IL6* oraz ocenę związku tych haplotypów z predyspozycją do bliznowca.

3. Materiał i metody

3.1 Pacjenci z bliźnowcem

Za zgodą Komisji Bioetycznej PUM (KB-0012/135/12) identyfikację polimorfizmów rs1800795, rs1800796 i rs1800797 genu *IL6* i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* przeprowadzono w próbkach genomowego DNA wyizolowanego z krwi obwodowej 86 dorosłych chorych z bliźnowcem. Grupę tę stanowiło 69 kobiet i 17 mężczyzn w wieku 18-70 lat operowanych kolejno z powodu bliźnowca w latach 2012-2017 w Aesthetic Med w Szczecinie. Szczegółową charakterystykę pacjentów z bliźnowcem przedstawiono w tabeli 4.

3.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną dla porównania rozpowszechnienia analizowanych polimorfizmów *IL6* i *IL6R* (w stosunku do grupy osób z bliźnowcem) stanowiło 100 zdrowych, donoszonych noworodków. Z Banku DNA Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (PUM) losowo wybrano próbki genomowego DNA wyizolowanego z krwi pępowinowej kolejnych 100 zdrowych donoszonych noworodków (49 dziewczynek i 51 chłopców) urodzonych w latach 2005-2011 w Klinice Patologii Noworodka PUM. Próbkę krwi pępowinowej zgromadzone w Banku DNA były pobierane za zgodą rodziców dzieci w ramach projektu zaaprobowanego przez Komisję Bioetyczną PUM (BN-001/5/05, KB-0012/31/15). Kryteria wyłączenia z tego projektu obejmowały: ciążę mnogą, poród przed zakończeniem 37. tygodnia ciąży, wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu, cukrzycę ciężarnych, aberracje chromosomowe lub/i wady wrodzone.

3.3. Metodyka badań molekularnych

Materiał do badań stanowił genomowy DNA wyizolowany z leukocytów obwodowej (pacjenci z bliźnowcem) lub krwi pępowinowej (noworodki) przy zastosowaniu, zgodnie z instrukcją producenta, zestawu QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen).

Tabela 4. Charakterystyka kliniczna pacjentów z bliznowcem (n=86)

Zmienna	Liczba pacjentów, n (%)
Wywiad rodzinny w kierunku bliznowca (krewni pierwszego stopnia)	10 (11.6)
Kobiety	69 (80.2)
Mnogie (≥ 2) bliznowce	26 (30.2)
Etiologia bliznowców:	
Powikłania pooperacyjne	47 (54.6)
Powikłania pourazowe	9 (10.5)
Oparzenia	9 (10.5)
Przekłucie płatka ucha	5 (5.8)
Szczepienie	2 (2.3)
Ukąszenie owada	2 (2.3)
Nieznana	12 (14.0)
Lokalizacja bliznowca:	
Głowa i szyja	28 (26.4)
Klatka piersiowa	23 (21.7)
Plecy	10 (9.4)
Brzuch	13 (12.3)
Kończyny	32 (30.2)
Łączna liczba bliznowców *	106 (100.0)

* Z powodu występowania u niektórych osób zmian mnogich o różnej lokalizacji liczba bliznowców (n=106) jest większa niż liczba badanych pacjentów.

Identyfikację genotypów polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* przeprowadzono metodą PCR-RFLP, a polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* metodą sekwencjonowania.

W amplifikacji metodą PCR fragmentu promotora genu *IL6* zawierającego trzy polimorfizmy pojedynczych nukleotydów tj. rs1800797, rs1800796 i rs1800795 zastosowano oligonukleotyd 5'-CAACCTCCTCTAAGTGGGCTGAA-3' jako starter sensowny, a oligonukleotyd: 5'-CAATCAGCCCCACCCGC -3' jako starter antysensowny. Produktem PCR z tą parą starterów jest amplikon o długości 600 par zasad (pz). Na podstawie wstępnych doświadczeń ustalono optymalne warunki amplifikacji DNA metodą PCR, a mianowicie: amplifikację genomowego DNA prowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 15 µl zawierającej: 1,5 µl (40 ng) genomowego DNA, 7,5 µl 2x PCR Master Mix, po 0,15 µl (20 pmol/µl) startera sensownego i antysensownego i 5,7 µl H₂O wolnej od nukleaz. Pierwszą fazą PCR była denaturacja wstępna w temp. 94° C przez 5 minut, a następnie 36 cykli amplifikacji, gdzie każdy z cykli złożony był z 3 segmentów: denaturacji w temp. 94°C przez 20 sekund, trwającej 40 sekund hybrydyzacji starterów w temp. 56° C oraz wydłużania łańcucha (elongacji) w temperaturze 72° C przez 40 sekund. Ostatnim etapem amplifikacji metodą PCR była końcowa elongacja w temp. 72° C przez 8 min. Wszystkie amplifikacje przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf). Startery zostały zsyntetyzowane przez firmę TIB MOL.BIOL., Poznań. Pozostałe odczynniki, w tym i enzymy restrykcyjne zastosowane w kolejnym etapie analiz pochodziły z firmy MBI Fermentas (Litwa).

Po zakończeniu amplifikacji mieszaninę reakcyjną rozdzielano w równych częściach (po 5 µl) do 3 osobnych probówek, z których dwie pierwsze inkubowano w 37°C przez 24 h a trzecią w 37°C przez 30 minut z właściwymi enzymami restrykcyjnymi. W pierwszej probówce (identyfikacja rs1800797) z enzymem *FastDigest FokI*, w drugiej (identyfikacja rs1800796) z enzymem restrykcyjnym *SsiI (AciI)*, a w trzeciej (identyfikacja rs1800795)

inkubowano produkty PCR z enzymem restrykcyjnym *HinIII* (*NlaIII*) (wszystkie enzymy restrykcyjne pochodziły z ThermoFisher Scientific Polska).

Fragmety restrykcyjne rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z Midori Green Advanced DNA Stain (NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Niemcy) w buforze 1xTBE (2mM EDTA, 0,089M H₃BO₃, 0,089M TRIS, pH 8,0) w temperaturze pokojowej przy napięciu 75V. W celu określenia długości otrzymanych fragmentów restrykcyjnych zastosowano wzorzec masowy, marker długości DNA: pUC Mix Marker 8 (MBI Fermentas). Rozdziały elektroforetyczne dokumentowano poprzez wykonanie zdjęć i ich archiwizację przy wykorzystaniu zestawu G:BOX BioImaging System (Syngene). Wyniki identyfikacji polimorfizmów *IL6* weryfikowano poprzez sekwencjonowanie losowo wybranych 10 próbek DNA o różnych genotypach. Sekwencjonowanie amplikonów *IL6* wykonano według procedury szczegółowo opisanej poniżej dla identyfikacji polimorfizmu *IL6R*.

W amplifikacji metodą PCR fragmentu genu *IL6R* z rs2228145 zastosowano jako starter sensowny oligonukleotyd 5'-AAATGGCCTGTTGGTTGG-3', a jako starter antysensowny oligonukleotyd 5'-CACCTACTATTATGCCAAGCCGT-3'. Produktem PCR z tą parą starterów jest amplikon o długości 429 par zasad (pz). Na podstawie wstępnych doświadczeń ustalono optymalne warunki amplifikacji DNA metodą PCR, a mianowicie: amplifikację genomowego DNA prowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 15 µl zawierającej: 1,5 µl (40 ng) genomowego DNA, 7,5 µl 2x PCR Master Mix, po 0,15 µl (20 pmol/µl) startera sensownego i antysensownego i 5,7 µl H₂O wolnej od nukleaz. Pierwszą fazą PCR była denaturacja wstępna w temp. 94° C przez 5 minut, a następnie 36 cykli amplifikacji, gdzie każdy z cykli złożony był z 3 segmentów: denaturacji w temp. 94°C przez 20 sekund, trwającej 40 sekund hybrydyzacji starterów w temp. 54° C oraz wydłużania łańcucha (elongacji) w temperaturze 72° C przez 40 sekund. Ostatnim etapem amplifikacji metodą PCR była końcowa elongacja w temp. 72° C przez 8 min. Analogicznie, jak miało to miejsce w analizie polimorfizmów *IL6*, wszystkie amplifikacje przeprowadzono w termocyklerze

Mastercycler gradient (Eppendorf), startery do PCR zostały zsyntetyzowane przez firmę TIB MOL.BIOL., Poznań, a pozostałe odczynniki pochodziły z firmy MBI Fermentas (Litwa).

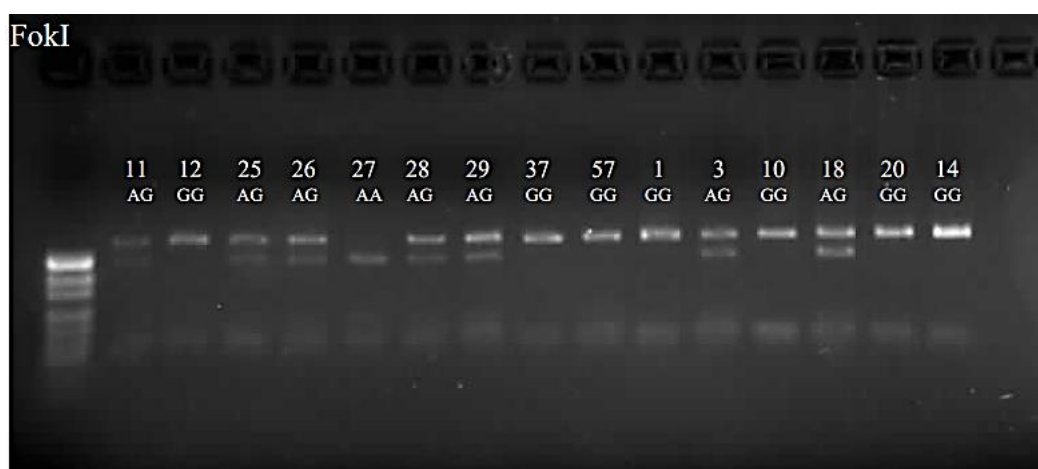
Otrzymane amplikony oczyszczano z nadmiaru nukleotydów i starterów poprzez dodanie do 5 μl produktu PCR po 0,5 μl enzymu Exonuclease I (10U) i 1 μl FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1U) (Applied Biosystems, USA) i inkubację tej mieszaniny w termocyklerze przez 15 min. w 37° C i przez 15 min. w 85° C. Następnie przy użyciu odczynników z zestawu BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) przygotowano mieszaninę do reakcji sekwencjonowania (objętość 10 μl), która zawierała: 2 μl Terminator Ready Reaction Mix, 1 μl Sequencing Buffer, 1,6 μl startera [20 pmol/ μl], 4,4 μl H₂O wolnej od nukleaz i 1 μl produktu PCR. Tak przygotowane próbki inkubowano w termocyklerze Mastercycler gradient (Eppendorf) przez 1 minutę w temp. 96° C, a następnie przez 25 cykli, z których każdy składał się z 3 segmentów: inkubacji w 96° C przez 10s, w 50° C przez 5s oraz w 60° C przez 4 minuty. Po zakończeniu tej reakcji otrzymane produkty oczyszczano metodą EtOH/NaOAc. W tym celu, do każdej próbki zawierającej produkty tej reakcji dodawano po 26 μl roztworu EtOH/NaOAc (1 μl 3M NaOAc, pH 5.2, 25 μl 99,9% EtOH), zawartość próbki starannie mieszano i wirowano w wirówce Centrifuge 5415 D (Eppendorf) przez 20 min. (5305xg). Następnie, po uprzednim usunięciu roztworu, do każdej z próbek dodano po 75 μl 70% EtOH, a następnie próbki te wirowano przez 5 min. z przyspieszeniem 5305xg w wirówce Centrifuge 5415 D (Eppendorf). Po zakończeniu wirowania i usunięciu roztworu, odwrócone próbki wirowano przez 1 minutę w tej samej wirówce, ale z przyspieszeniem 1326xg. Do każdej z próbek z tak oczyszczonymi produktami dodawano 10 μl dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems), a analizę sekwencji tych amplikonów badanych regionów genów *IL6* i *IL6R* wykonano w aparacie ABI PRISM[®] 3130 (Applied Biosystems). Wyniki tej analizy odczytywano przy zastosowaniu oprogramowania Sequencing Analysis v5.1 (Applied Biosystems).

3.4. Analiza statystyczna

Za pomocą testu χ^2 przeprowadzono ocenę zgodności rozkładu genotypów polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* z prawem Hardy'ego-Weinberga (HWE, ang. *Hardy-Weinberg equilibrium*) zarówno w połączonej grupie złożonej z pacjentów z bliznowcem i noworodków, jak i odrębnie w grupie z bliznowcem i w grupie kontrolnej. W porównaniu rozkładu genotypów *IL6* i *IL6R* pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną zastosowano metodę regresji logistycznej (z uwzględnieniem korekty względem płci) dla addycyjnego, dominującego i recesywnego modelu dziedziczenia alleli o większej częstości. Następnie przy pomocy modułu „genetics” pakietu R (wersja 3.1.0) analizowano nierównowagę sprzężenia (LD, linkage disequilibrium) pomiędzy poszczególnymi parami polimorfizmów *IL6* tj. rs1800797-rs1800796, rs1800797-rs1800795 oraz rs1800796-rs1800795. Kolejnym etapem analizy statystycznej była rekonstrukcja przy pomocy funkcji *haplo.em* modułu „haplo.stats” pakietu R haplotypów złożonych z tych trzech polimorfizmów *IL6* (rs1800797-rs1800796-rs1800795) oraz porównanie rozkładu częstości poszczególnych haplotypów w grupie pacjentów z bliznowcem i w grupie kontrolnej noworodków. W porównaniu rozkładu haplotypów pomiędzy grupami zastosowano metodę regresji logistycznej z uwzględnieniem korekty względem płci i dla modeli dziedziczenia analogicznych, jak w analizie pojedynczych polimorfizmów. Wszystkie analizy, które nie były wykonane przy pomocy programu R, zostały przeprowadzone w programie STATISTICA (Dell Inc. 2016, wersja 13). Za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0.05$.

4. Wyniki

Polimorfizmy rs1800797 (-597G>A), rs1800796 (-572G>C) i rs1800795 (-174G>C), promotora genu *IL6* identyfikowano metodą PCR-RFLP, a identyfikację genotypów polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* (c.1073A>C, p.Asp358Ala), przeprowadzono metodą sekwencjonowania. Dla każdej z próbek DNA od pacjentów z bliznowcem oraz od noworodków z grupy kontrolnej uzyskano amplikony dobrej jakości pozwalające na jednoznaczną identyfikację genotypów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 *IL6* metodą PCR-RFLP (ryciny 1-3) i ich weryfikację metodą sekwencjonowania (rycina 4), a także na identyfikację genotypów rs2228145 *IL6R* metodą sekwencjonowania (rycina 5). Sekwencjonowanie losowo wybranych 10 spośród 186 próbek DNA wykazało pełną zgodność z wynikami identyfikacji genotypów trzech polimorfizmów *IL6* uzyskanymi metodą PCR-RFLP (rycina 4).



Rycina 1. Identyfikacja polimorfizmu rs1800797 genu *IL6* (-597G>A) metodą PCR-RFLP

Genotypy:

AA: fragmenty restrykcyjne o długości 471pz i 129pz

GG: fragment restrykcyjny o długości 600pz

AG: fragmenty restrykcyjne o długości 600pz, 471pz i 129pz



Rycina 2. Identyfikacja polimorfizmu rs1800796 genu *IL6* (-572G>C) metodą PCR-RFLP

Genotypy:

GG: fragmenty restrykcyjne o długości 456pz, 90pz, 51pz i 3pz

GC: fragmenty restrykcyjne o długości 546pz, 456pz, 90pz, 51pz i 3pz

CC: fragmenty restrykcyjne o długości 546pz, 51pz i 3pz



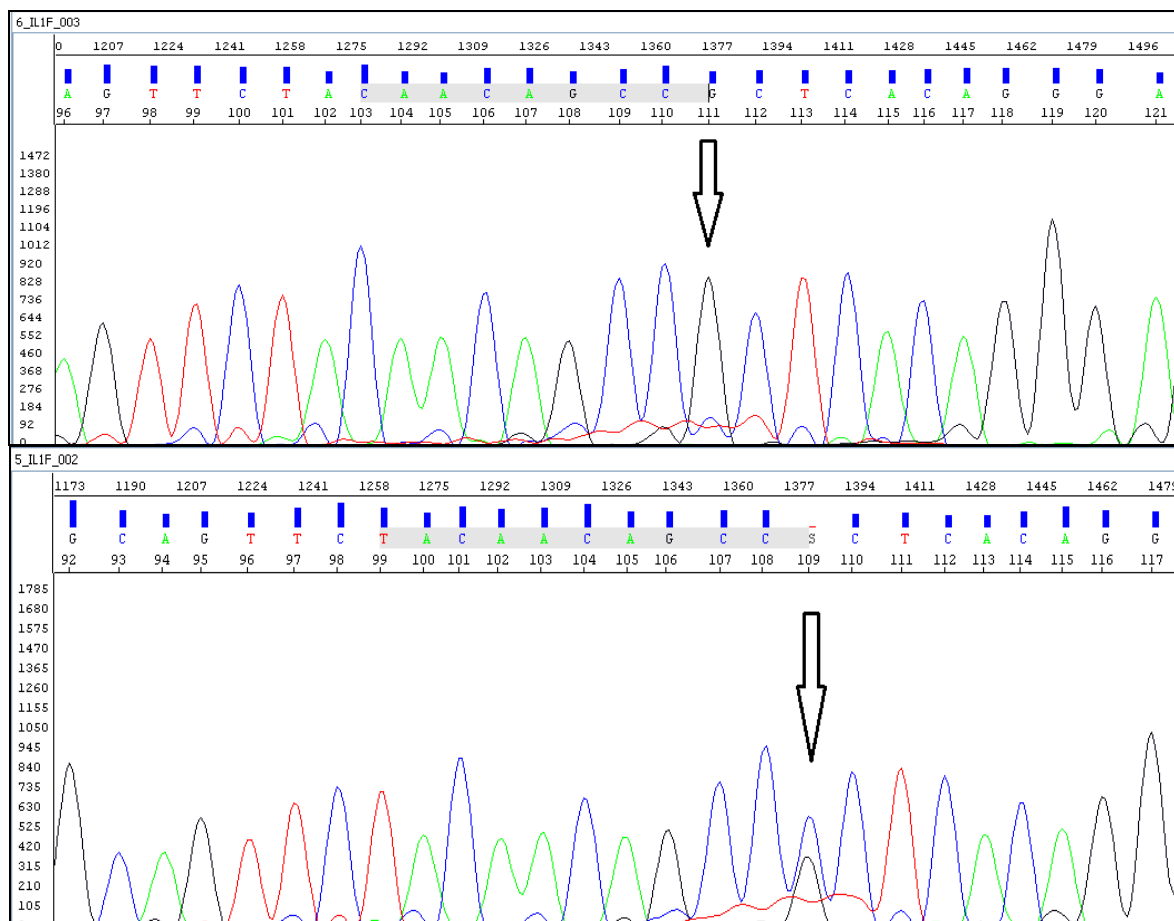
Rycina 3. Identyfikacja polimorfizmu rs1800795 genu *IL6* (-174G>C) metodą PCR-RFLP

Genotypy:

GG: fragmenty restrykcyjne o długości 394pz, 177pz i 29pz

GC: fragmenty restrykcyjne o długości 394pz, 177pz, 122pz, 55pz i 29pz

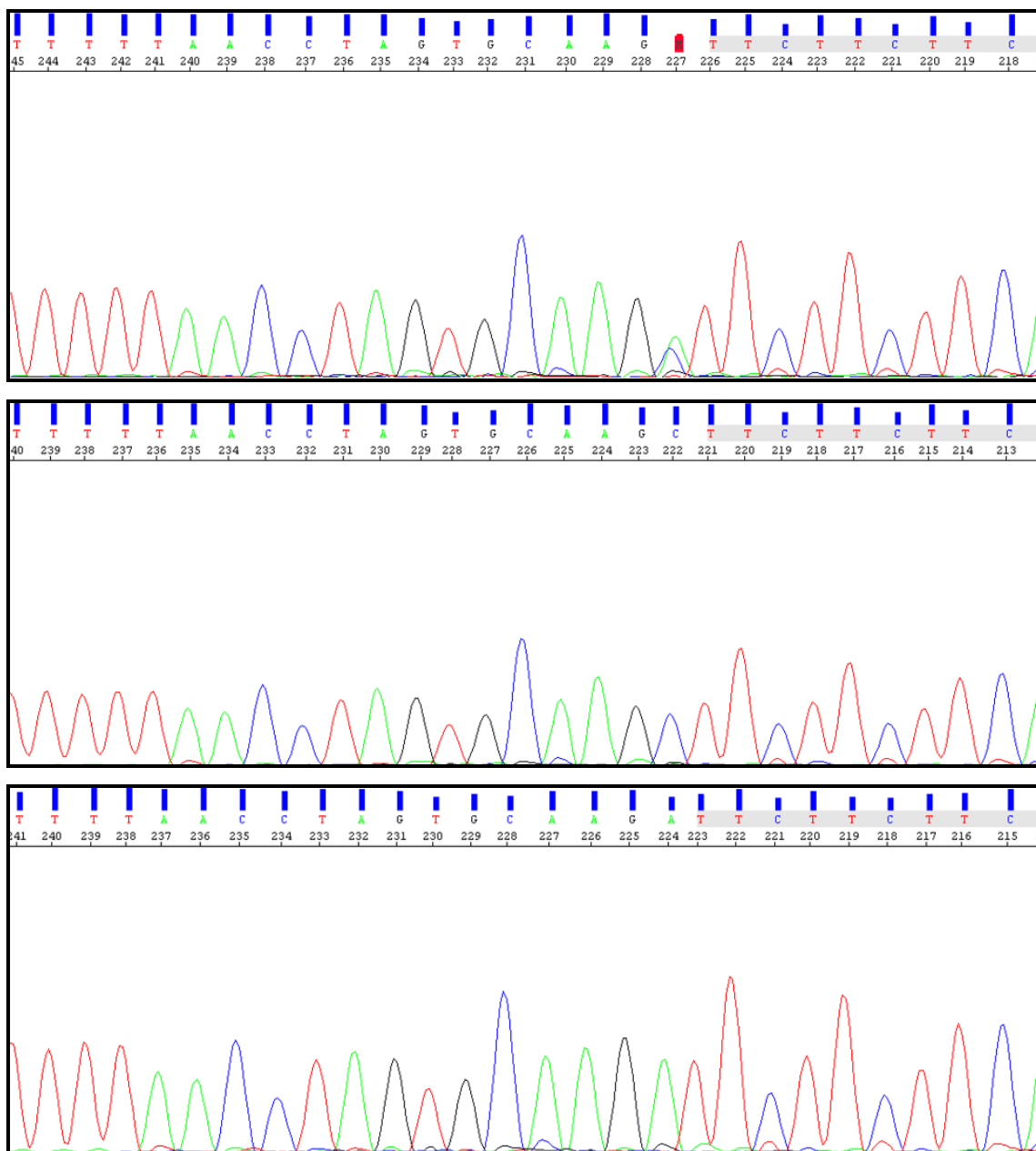
CC: fragmenty restrykcyjne o długości 394pz, 122pz, 55pz i 29pz



Rycina 4. Chromatogramy sekwencyjne dla rs1800796 genu *IL6* (-572G>C)

Góra: homozygota GG

Dół: heterozygota GC



Rycina 5. Chromatogramy sekwencyjne dla rs2228145 *IL6R*

Góra: heterozygota AC

Środek: homozygota CC

Dół: homozygota AA

Rozkłady genotypów polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* w grupie pacjentów z bliznowcem, w grupie noworodków (grupa kontrolna), a także w grupie utworzonej z połączenia obu tych grup były zgodne z rozkładem teoretycznym wynikającym z równowagi Hardy'ego-Weinberg'a

(wartości p wynosiły, odpowiednio, dla rs1800797: 0.892, 0.619 i 0.364; dla rs1800796: 0.205, 0.523 i 0.302, dla rs1800795: 0.932, 0.408 i 0.368, a dla rs2228145: 0.858, 0.889 i 0.674).

Pomiędzy grupą pacjentów z bliznowcem i grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie częstości alleli i genotypów dla polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* (tabela 5).

Następnie dla trzech polimorfizmów promotora *IL6* oceniono nierównowagę sprzężenia (*linkage disequilibrium*, LD). Spośród trzech możliwych par polimorfizmów tj. rs1800797-1800795, rs1800797-rs1800796 i rs1800796-rs1800795 jedynie ta pierwsza znajduje się w istotnej ($p < 2.22 \times 10^{-1}$) i bardzo ścisłej nierównowadze sprzężenia czego wyrazem są bliskie jedności wartości współczynników D' i R^2 (tabela 6).

Wyniki analizy nierównowagi sprzężenia posłużyły do rekonstrukcji haplotypów *IL6*. Zgodnie z wzorem $H=A^n$, gdzie H to liczba haplotypów, A to liczba alleli danego polimorfizmu, n to liczba polimorfizmów, trzy polimorfizmy pojedynczych nukleotydów promotora genu *IL6* mogą tworzyć co najwyżej 8 haplotypów. W grupie pacjentów z bliznowcem nie stwierdzono jednego z haplotypów tj. A-C-G (kolejność alleli: rs1800797-rs1800796-rs1800795), a wśród noworodków trzech haplotypów tj. A-C-G, a także A-C-C (H1) i G-C-C (H4) (tabela 7). Trzy haplotypy: A-C-C (H1), G-C-C (H4) i G-G-C (H6), których częstość w całej badanej grupie była mniejsza niż 2.0% w dalszej analizie traktowano łącznie jako haplotypy rzadkie. Pomiędzy grupą z bliznowcem i grupą kontrolną nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie częstości haplotypów w analizie przeprowadzonej w modelu regresji logistycznej (z uwzględnieniem korekty względem płci i dla poszczególnych typów dziedziczenia), w której haplotyp G-G-G (H7) o największej częstości był traktowany jako haplotyp referencyjny (tabela 8).

Tabela 5. Analiza rozpowszechnienia alleli i genotypów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* oraz rs2228145 genu *IL6R* w pacjentów z bliznowcem i w grupie kontrolnej

Polimorfizm ^a (Pozycja)	Allel ^b (1/2)	Bliznowiec (n _a =2n) ^c 1/2 (%)	Kontrola (n _a =2n) ^c 1/2 (%)	p	Bliznowiec (n=86)			Kontrola (n=100)			p _A	p _R	p _D
					11	12 (%)	22	11	12 (%)	22			
rs1800797 (7:22726602)	G/A	102/70 (59.3/40.7)	123/77 (61.5/38.5)	0.665	32 (37.2)	38 (44.2)	16 (18.6)	39 (39.0)	45 (45.0)	16 (16.0)	0.865	0.794	0.963
rs1800796 (7:22726627)	G/C	154/18 (89.5/10.5)	188/12 (94.0/6.0)	0.115	70 (81.4)	14 (16.3)	2 (2.3)	88 (88.0)	12 (12.0)	0 (0.0)	- ^d	- ^d	0.212
rs1800795 (7:22727026)	G/C	105/67 (61.0/39.0)	125/75 (62.5/37.5)	0.773	33 (38.4)	39 (45.3)	14 (16.3)	41 (41.0)	43 (43.0)	16 (16.0)	0.946	0.824	0.942
rs2228145 (1:154454494)	A/C	105/67 (61.0/39.0)	127/73 (63.5/36.5)	0.626	31 (36.0)	43 (50.0)	12 (14.0)	40 (40.0)	47 (47.0)	13 (13.0)	0.334	0.977	0.181

^a Pozycje SNP według GRCh38.p13.

^b Allel 1 i allel 2 to odpowiednio: allel częstszy i allel rzadszy.

^c liczba alleli jest dwukrotnie większa niż liczba badanych osób

p_A, p_R i p_D - wartości p skorygowane względem płci w analizie regresji dla allelu 2 w addycyjnym, recesywnym i dominującym modelu dziedziczenia

^d – ze względu na bardzo małą częstość homozygot 22 (2 na 186 osób) analizę wykonano jedynie dla modelu dominującego (11 vs. 12+22)

Tabela 6. Analiza sprzężeń polimorfizmów genu *IL6*

[D`] (r ²) p<	rs1800797 (-597G>A)	rs1800796 (-572G>C)	rs1800795 (-174G>C)
rs1800797 (-597G>A)		[0.997] (0.040) <0.005	[0.978] (0.916) <2.22e-16
rs1800796 (-572G>C)	[0.997] (0.040) <0.005		[0.997] (0.038) <0.006
rs1800795 (-174G>C)	[0.978] (0.916) <2.22e-16	[0.997] (0.038) <0.006	

Tabela 7. Haplotypy *IL6* w całej badanej grupie oraz w grupie pacjentów z bliznowcem i w grupie kontrolnej

Haplotyp	Cała grupa (Bliznowiec + Kontrola) n (%)	Bliznowiec n (%)	Kontrola n (%)
H1 (A-C-C)*	5 (1.3)	5 (3.1)	0 (0.0)
H2 (A-G-C)	133 (35.8)	59 (34.0)	74 (37.0)
H3 (A-G-G)	9 (2.4)	6 (3.6)	3 (1.5)
H4 (G-C-C)*	1 (0.3)	1 (0.4)	0 (0.0)
H5 (G-C-G)	24 (6.4)	12 (6.9)	12 (6.0)
H6 (G-G-C)*	3 (0.8)	2 (1.4)	1 (0.5)
H7 (G-G-G)	197 (53.0)	87 (50.6)	110 (55.0)

* Haplotypy rzadkie o częstości mniejszej niż 2% w całej badanej grupie 186 osób.
Kolejność polimorfizmów w haplotypach: rs1800797- rs1800796- rs1800795

Tabela 8. Haplotypy *IL6* u pacjentów z bliznowcem i w grupie kontrolnej

Haplotyp	Bliznowiec n (%)	Kontrola n (%)	p _A	p _R	p _D
H2	59 (34.0)	74 (37.0)	0.927	0.806	0.974
H3	6 (3.6)	3 (1.5)	0.287	0.484	0.269
H5	12 (6.9)	12 (6.0)	0.235	-	0.287
H1+H4+H6	8 (4.9)	1 (0.5)	0.205	-	0.222
H7	87 (50.6)	110 (55.0)	Haplotyp referencyjny		

p_A, p_R i p_D - wartości p skorygowane względem płci w analizie regresji dla poszczególnych haplotypów w addycyjnym, recesywnym i dominującym modelu dziedziczenia w odniesieniu do haplotypu referencyjnego (H7)

5. Dyskusja

Według mojej wiedzy niniejsza rozprawa jest pierwszą pracą dotyczącą analizy związku funkcjonalnych polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 promotora genu *IL6* kodującego interleukinę 6 i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* kodującego podjednostkę alfa receptora dla IL6 z predyspozycją do bliznowca u Polaków.

Interleukina-6 (IL6) została odkryta w 1986 roku jako czynnik stymulujący limfocyty B i inicjujący wytwarzanie przez nie immunoglobuliny G [71-72]. Badania prowadzone w kolejnych latach wykazały, że IL6 jest plejotropową cytokiną, która nie tylko reguluje aktywność układu immunologicznego, reakcje ostrej fazy i odpowiedź zapalną, ale także wywiera istotny wpływ na hematopoezę, metabolizm i rozwój narządów [73]. Warto zauważyć, że interleukina 6 może jednocześnie wywoływać różne, niekiedy wręcz przeciwstawne procesy fizjopatologiczne, co prawdopodobnie jest skutkiem aktywacji dwóch szlaków transdukcji sygnału tej cytokiny tj. ścieżki klasycznej poprzez receptor IL6 związany z błoną komórkową i ścieżki transsygnalizacyjnej zależnej od wiązania tego liganda z rozpuszczalną formą receptora dla IL6 [71,74-77].

W promotorze genu *IL6* kodującego interleukinę 6 w regionie pierwszych 1200 par zasad w kierunku 5` od miejsca inicjacji transkrypcji zidentyfikowano kilka sekwencji rozpoznanych przez białka regulatorowe tego transkrypcji (elementy *cis*). Dwie takie sekwencje to para elementów odpowiedzi na glukokortykosteroidy (GRE, Glucocorticoid Response Elements) znajdują się w pozycjach od -557 do -552 i od -466 do -461 promotora [78]. Następnie w regionie od -283 do -277 (sekwencja: TGAGTCA) znajduje się miejsce wiążące czynnik transkrypcyjny AP-1 (Activator Protein 1)[79]. Z kolei w regionie od -169 do -124 zidentyfikowano tzw. surowiczy element odpowiedzi (SRE, Serum Responsive Element) [80], który zawiera podstawową sekwencję (ACGTCA) elementu odpowiedzi na cykliczny AMP (CRE,

cAMP Response Element) aktywowaną przez czynnik transkrypcyjny CREB (cAMP Response Element-Binding [81-82], a także połowę sekwencji wiążącej NF- κ B (od pozycji -163 do -145) [83,84]. Miejsca AP-1 i CRE mają wysoki stopień homologii sekwencji, gdyż różnią się tylko dwoma nukleotydami [85]. Domniemane miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego NF- κ B położone jest między nukleotydami -75 a -64 [79]. Należy jednak zauważyć, że miejsce to pokrywa się z motywem rozpoznawanym przez RBP (Recombination-signal Binding Protein), a związanie tego białka zmniejsza ekspresję interleukiny 6 indukowaną przez NF- κ B [86,87].

Polimorfizmy w promotorze genu *IL6* warunkujące międzyosobnicze różnice w regulacji transkrypcji i ekspresji tego genu, a przez to i nasilenie procesu wytwarzania tej cytokiny kształtują predyspozycję do określonych chorób [88]. Według aktualnej wiedzy, cztery główne polimorfizmy pojedynczych nukleotydów promotora genu *IL6* wywierające wspólnie wpływ na transkrypcję tego genu to -2954G>C i -1363G>T oraz -597G>A (rs1800797) i -572G>C (rs1800796) tj. dwa warianty analizowane w niniejszej rozprawie [89-91]. Z kolei, trzeci z polimorfizmów *IL6* (tj. -174G>C, rs1800795) analizowanych w mojej rozprawie położony jest w tzw. negatywnej domenie regulatorowej (region od -225 do -164) znajdującej się w pobliżu CRE. Należy też zaznaczyć, że polimorfizm ten zlokalizowany jest w sekwencji częściowo homologicznej z elementem wiążącym Smad4, a także iż w porównaniu do allela typu dzikiego (tj. -174G) allel -174C bardziej efektywnie wiąże Smad4, a tym samym silniej hamuje transkrypcję genu interleukiny 6 [92].

Według GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) do 12.01.2023r. w oparciu o stojące najwyżej w hierarchii wiarygodności dowodów naukowych, badania asocjacyjne całego genomu odkryto związek polimorfizmu rs1800797 z predyspozycją do astmy [93-95] i tocznia układowego trzewnego [96], polimorfizmu rs1800796 z liczbą płytek

krwi [97], a polimorfizmu rs1800795 z ciśnieniem tętna [98,99] i ze stężeniem klasteryny w płynie mózgowo-rdzeniowym [100].

W odróżnieniu od jedynej dostępnej w piśmiennictwie pracy autorów japońskich [55] poświęconej analizie związku trzech powyższych polimorfizmów genu *IL6* z predyspozycją do bliznowca, w swojej rozprawie nie wykazałam związku pomiędzy żadnym z tych wariantów genetycznych a ryzykiem tej choroby. Należy jednak w tym miejscu zaznaczyć, że Tosa i wsp. dla dwóch spośród 3 analizowanych polimorfizmów *IL6* tj. dla rs1800797 i rs1800795 zarówno osób w grupie badanej, jak i w grupie kontrolnej identyfikowali wyłącznie genotypy typu dzikiego (tj. homozygotyczne genotypy GG dla każdego z tych SNP)[55], co jest w pełni zgodne z wynikami z projektu 1000 Genomów (1000 Genome Project) (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:22726102-22727102;v=rs1800797;vdb=variation;vf=729516893 i http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:2272652622727526;v=rs1800795;vdb=variation;vf=729516845) dla Japończyków (wskazali na to już sami autorzy) oraz dla trzech grup Chińczyków (Chińczyków Han z Pekinu, Chińczyków Han z południowych Chin oraz mniejszości Dai z prefektury Xishuangbanna). Jedynie trzeci z polimorfizmów *IL6* (tj. rs1800796) analizowanych przez Tosa i wsp. okazał się być u Japończyków czynnikiem genetycznym predysponującym do bliznowca [55]. Warto jednak zauważyć, że w tym badaniu z Japonii w dwóch odrębnych grupach kontrolnych częstość allelu ryzyka bliznowca (tj. -572G rs1800796) wynosiła 16.5% i 17.3%, a w dwóch odrębnych grupach pacjentów z bliznowcem, odpowiednio: 27.4% i 26.5%. Według projektu 1000 Genomów częstość tego allelu rs1800796 w populacji Japonii wynosi 17.8%, a dla Chińczyków Han z Pekinu 28.2%, Chińczyków Han z południowych Chin 21.4%, a dla osób z mniejszości Dai 17.7%

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:22726127-22727127;v=rs1800796;vdb=variation;vf=729516870).

Powołanie się na dane z projektu 1000 Genomów dotyczące Chin ma szczególne znaczenie w kontekście opublikowanej w 2017 roku pracy Zhou i wsp., którzy analizowali związek polimorfizmu rs1800796 i rs1800795 *IL6* z podatnością do bliźnowca u Chińczyków Han z prowincji Jiangsu położonej w środkowej części wschodniego wybrzeża Chin [27]. W tym badaniu częstość alleli -572G i -174C genu *IL6* w grupie kontrolnej wynosiły, odpowiednio: 29.9% i 35.2%, a w grupie badanej, odpowiednio: 35.9% i 33.3%. W badaniu Zhou i wsp. różnica w rozpowszechnieniu polimorfizmu -572G>C była statystycznie istotna, co potwierdziło wcześniejsze obserwacje Tosa i wsp. u Japończyków [55]. Związek polimorfizmu rs1800796 z predyspozycją do bliźnowca w roku 2019 potwierdzili również autorzy z Egiptu, którzy stwierdzili, że w tym kraju częstość allelu ryzyka (-572G) wynosiła aż 67.5% u pacjentów z bliźnowcem, a u osób w grupie kontrolnej była ponad 2 x mniejsza i wynosiła 26.7%. Wyniki tego ostatniego doniesienia powinny być jednak interpretowane bardzo ostrożnie, gdyż w tym projekcie grupę badaną stanowiło jedynie 60 pacjentów, a grupę kontrolną tylko 30 osób.

W odróżnieniu Japończyków z pracy Tosa i wsp. [55], w badanych przeze mnie w rozprawie grupach Polaków tj. chorych z bliźnowcem i zdrowych donoszonych noworodków stanowiących grupę kontrolną, zmienność dotyczyła każdego z trzech polimorfizmów promotora *IL6*, co pozwoliło mi nie tylko na analizę związku każdego z nich z podatnością do choroby, ale także na określenie nierównowagi sprzężenia pomiędzy każdą parą polimorfizmów, a przez to i na rekonstrukcję haplotypów i ocenę związanego z nimi ryzyka choroby. Dodam również, że w mojej pracy zarówno grupa badana, jak i grupa kontrolna były złożone z osób urodzonych na Pomorzu Zachodnim

tj. będących potomkami osób, które przybyły na te ziemie po II wojnie światowej z niemal wszystkich regionów dawnej II Rzeczypospolitej [101,102]. Dlatego też współcześni mieszkańcy Pomorza Zachodniego są uznawani za próbę reprezentatywną dla populacji polskiej m.in. w badaniach z zakresu epidemiologii genetycznej [103,104]. Z kolei, losowy dobór do grupy kontrolnej noworodków, które przyszły na świat w jednym ze szpitali w Szczecinie pozwoliło dodatkowo na zminimalizowanie ryzyka popełnienia błędu populacyjnego (ang. population bias) i błędu stratyfikacji (ang. stratification bias)[104].

W tym miejscu należy zwrócić uwagę na duże, związane z pochodzeniem etnicznym, różnice pomiędzy częstością polimorfizmu -572G>C (rs1800796) u badanych przeze mnie Polaków, a dostępnymi z powyższych publikacji danymi dotyczącymi rozpowszechnienia tego polimorfizmu wśród Japończyków, Chińczyków i Egipcjan [27,55,58]. W mojej pracy częstość allelu -572G u chorych z bliznowcem wynosiła bowiem 89.5% i aż 94.0% w grupie kontrolnej złożonej z noworodków, a wartości te są bardzo zbliżone do częstości tego wariantu u Polaków (94.4%) przedstawionej przez Maculewicz i wsp. [105] oraz do jego częstości w innych krajach Europy analizowanych w projekcie 1000 Genomów tj. w Finlandii (94.9%), w Wielkiej Brytanii (96.2%), Hiszpanii (94.9%) i Włoszech (94.9%) oraz w populacji CEU (95.5%) tj. u mieszkańców stanu Utah, których przodkowie przybyli do USA z krajów północnej i zachodniej Europy (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=7:22726127-22727127;v=rs1800796;vdb=variation;vf=729516870).

W odróżnieniu od Tosa i wsp. [55], którzy w przypadku polimorfizmów rs1800797 i rs1800795 genu *IL6* wykrywali wśród Japończyków jedynie genotypy typu dzikiego w swojej pracy przeprowadziłam analizę oceny stopnia nierównowagi sprzężeń dla

każdej z możliwych par polimorfizmów tj. rs1800797-rs1800796, rs1800797-rs1800795 i rs1800796-rs1800795, a następnie w oparciu o jej wyniki wykonałam rekonstrukcję haplotypów złożonych z trzech alleli: rs1800797-rs1800796-rs1800795.

Dla trzech analizowanych par polimorfizmów promotora *IL6* stwierdziłam bardzo ścisłą (niemal całkowitą) nierównowagę sprzężenia dla polimorfizmu w pozycji -597 (rs1800797) i w pozycji -174 (rs1800795). Ponieważ w piśmiennictwie brak jest danych dotyczących nierównowagi sprzężenia tych 3 polimorfizmów *IL6* u Polaków, za pomocą dostępnego w Internecie darmowego narzędzia bioinformatycznego <https://ldlink.nci.nih.gov/r> przeprowadziłam taką analizę dla grupy osób pochodzenia europejskiego z projektu 1000 Genomów. Wyniki mojej analizy opartej na ocenie grupy złożonej z 503 osób z Finlandii, Wielkiej Brytanii, Hiszpanii i Włoch oraz należących do populacji CEU potwierdziły tę istotną i bardzo ścisłą ($D' = 1.0$, $R^2 = 0.9717$) nierównowagę sprzężenia polimorfizmów rs1800797-rs1800795.

Trzy dwualleliczne polimorfizmy mogą maksymalnie tworzyć 8 haplotypów, a wśród 372 haplotypów (186 osób x 2 haplotypy na osobę) nie stwierdziłam występowania haplotypu A-C-G. Z kolei, częstość haplotypów: A-C-C (H1), G-C-C (H4) i G-G-C (H6) była mniejsza niż 2% i stąd w dalszej analizie były traktowane łącznie jako haplotypy rzadkie. Za haplotyp referencyjny w tych analizach przyjęto haplotyp G-G-G (H7) o największej częstości (52.9%). Ponieważ w dostępnym mi piśmiennictwie nie znalazłam publikacji dotyczących rozpowszechnienia haplotypów rs1800797-rs1800796-rs1800795 w populacji Polski, postanowiłam, analogicznie jak miało to miejsce dla nierównowagi sprzężenia, przeprowadzić, również przy użyciu narzędzia <https://ldlink.nci.nih.gov/>, taką analizę dla populacji pochodzenia europejskiego z projektu 1000 Genomów (503 osoby x 2 haplotypy = 1006 haplotypów). Spośród 8 możliwych haplotypów u osób tych występują jedynie 4 haplotypy tj. A-G-C

(40.7%), G-C-G (4.8%), G-G-C (0.8%) i G-G-G (53.7%), a ich częstości są bardzo zbliżone do rozpowszechnienia tych haplotypów w badanej przez mnie grupie Polaków.

W klasycznej ścieżce sygnalizacji interleukina 6 najpierw łączy się z podjednostką alfa swojego receptora (IL6R α , gp80 lub CD126), która jest przezbłonowym białkiem o masie cząsteczkowej 80 kDa, a następnie oba te białka razem wiążą się z podjednostką beta receptora (IL6R β , gp130 lub CD130), przezbłonowym białkiem o masie cząsteczkowej 130 kDa, tworząc stabilny kompleks (a właściwie heksamer utworzony przez dwie cząsteczki liganda, dwie podjednostki gp80 i dwie podjednostki gp130) [106-108]. Dopiero wtedy możliwym staje się dalsze przekazanie sygnału IL6, co zachodzi poprzez aktywację trzech ścieżek wewnątrzkomórkowych tj. ścieżki JAK/STAT (JANUS Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), która reguluje ekspresję kilku genów prowadząc do indukcji różnicowania wzrostu komórek i ich przeżycia [106-109], ścieżki PI3K/AKT (Phosphoinositide-3 Kinase/Protein Kinase B) związanej z przeżywalnością komórek [110,111] oraz ścieżki kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase), która uruchamia transkrypcję genów związanych z wzrostem, podziałami i różnicowaniem się komórek, a także z wytwarzaniem białek ostrej fazy i immunoglobulin [11,112]. Złożony z obu podjednostek błonowy receptor dla IL6 występuje tylko w kilku typach komórek m.in. w makrofagach, neutrofilach, limfocytach T CD4+, podocytach i hepatocytach, a zatem to tylko te komórki mogą bezpośrednio odpowiadać na interleukinę 6 [113,114]. Trans-sygnalizacja stanowi zaś alternatywę dla klasycznej ścieżki sygnalizacji IL6 i umożliwia jej modulowanie funkcji szerokiego spektrum komórek docelowych (m.in. komórek nowotworowych, neuronów lub osteoklastów, które nie mają receptora błonowego złożonego z podjednostki alfa i beta [115,116]. W

mechanizmie tym kluczową rolę odgrywa sIL6R, który zawiera zewnątrzkomórkową domenę gp80 i zachowuje zdolność wiązania IL6 porównywalną z błonową formą receptora [117-120]. Stąd też kompleks IL6/sIL6R może wiązać i aktywować występujące w błonach wielu typów komórek białko gp130 [121-124]. U człowieka sIL6R powstaje poprzez proteolizę katalizowaną przez metaloproteazy, co jest uznawane za podstawowy mechanizm tworzenia rozpuszczalnej formy receptora lub też w następstwie alternatywnego składania i translacji mRNA dla IL6R pozbawionego domen transbłonowych i cytozolowych [118,125-127]. W krążeniu w warunkach fizjologicznych i to w stosunkowo wysokim stężeniu (100–400 ng/ml) wykrywana jest również rozpuszczalna forma gp130 (sgp130)[128-132]. W przeciwieństwie jednak do sIL6R, sgp130 jest głównie generowany przez alternatywne składanie, a nie proteolizę [133]. Ponieważ sgp130 może wchodzić w interakcje z kompleksem IL6/sIL6R, działa jako swoisty inhibitor szlaku trans-sygnalizacyjnego tej cytokiny, nie wpływając jednak na klasyczną sygnalizację, w której pośredniczy błonowa forma receptora dla IL6 [134,135].

Przedstawione powyżej informacje wskazują, jak złożonymi procesami są obie ścieżki sygnalizacji interleukiny 6. Dodatkowym czynnikiem, który wywiera wpływ zarówno na sygnalizację klasyczną, jak i na trans-sygnalizację, jak również modulującym końcowy efekt będący wypadkową aktywacji obu ścieżek sygnalizacji jest polimorfizm rs2228145 (c.1073A>C, p.Asp358Ala) genu kodującego podjednostkę alfa receptora dla IL6. Jak przedstawiono to już we wstępie do rozprawy, w kilku badaniach potwierdzono iż obecność allela c.1073C tego polimorfizmu była związana z podwyższonym stężeniem sIL6R w surowicy [67-70].

Według GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) polimorfizm rs2228145 genu *IL6R* jest powiązany z reumatoidalnym zapaleniem stawów [136,137], z

stężeniami biomarkerów w płynie mózgowo-rdzeniowym [138] i białka we krwi [139], z odsetkiem monocytów [140], ze stężeniem podjednostki alfa IL6R [141] lub stężeniem IL6 [142], z chorobami alergicznymi (astma, katar sienny i wyprysk)[143], z zakrzepicą żylna lub stężeniem fibrynogenu [144], z leukocytozą i stężeniem CRP [145], z stężeniem żelaza [146], ze stężeniem LDL [147], a także z atopowym zapaleniem skóry [148].

Wyniki jedynej opublikowanej, jak dotąd, pracy dotyczącej analizy związku polimorfizmu rs2228145 z bliznowcem przeprowadzonej przez Tosa i wsp. u Japończyków, wskazują, że polimorfizm ten nie jest czynnikiem predysponującym do tej choroby [55]. Również w mojej rozprawie nie stwierdziłam, aby polimorfizm c.1073A>C był związany z ryzykiem pojawienia się bliznowca. Potwierdzenie przeze mnie wyników pracy autorów japońskich ma szczególne znaczenie, gdyż w odróżnieniu od 3 polimorfizmów promotora genu *IL6*, częstości polimorfizmu rs2228145 u osób pochodzenia europejskiego i u osób z Wschodniej Azji, w tym Japończyków, są zbliżone. W doniesieniu Tosa i wsp. częstość allele c.1073C *IL6R* wynosiła 39.1% u Japończyków z bliznowcem i 42.3% u Japończyków stanowiących grupę kontrolną, podczas gdy u Polaków z bliznowcem 39.0%, a u polskich noworodków tworzących grupę kontrolną 36.5%. Z kolei dane z projektu 1000 Genomów (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=1:154453994-154454994;v=rs2228145;vdb=variation;vf=1577933#_) wskazują, że częstość tego wariantu *IL6R* u osób z Wschodniej Azji wynosi średnio 32.3% i jest najniższa u osób z mniejszości Dai w Chinach (24.2%), a najwyższa (37.9%) u Chińczyków Han z Pekinu. Z kolei, wśród osób pochodzenia europejskiego najniższą częstość allele c.1073C stwierdzono u Finów (25.8%), a najwyższą (41.2%) u mieszkańców Wielkiej Brytanii. Z kolei, u Polaków częstość tego allele jest bardzo zbliżona do średniej (36.0%) z pięciu

populacji pochodzenia europejskiego z projektu 1000 Genomów i wynosiła od 33.2% do 40.1% [149-153,34].

W ostatniej części tego rozdziału należy jeszcze wskazać ograniczenia badania będącego podstawą niniejszej rozprawy. W mojej ocenie trzy najważniejsze z tych ograniczeń to różnice pomiędzy poszczególnymi grupami etnicznymi w rozpowszechnieniu analizowanych wariantów i w występowaniu fenotypu klinicznego jakim jest bliznowiec (szczegółowo opisane, odpowiednio: w poprzedzającej części tego rozdziału oraz w rozdziale „Wstęp”), a przede wszystkim stosunkowo niewielka liczebność grup włączonych do mojego projektu. Swoje analizy przeprowadziłam w grupie 186 Polaków, w tym 86 osób z bliznowcem, natomiast Tosa i wsp. [55] przeprowadzili identyfikację genotypów polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* oraz rs2228145 genu *IL6R* u 615 Japończyków, w tym 376 pacjentów z bliznowcem. Również Zhu i wsp. analizowali polimorfizmy rs1800796 i rs1800795 u 470 Chińczyków Han, w tym 224 osób z rozpoznaniem bliznowca [27]. Jedynie w pracy autorów egipskich [58], liczebność grupy (90 dorosłych Egipcjan, w tym 60 pacjentów z bliznowcem) w której badali oni polimorfizm rs1800796 *IL6* była zdecydowanie mniejsza niż w mojej rozprawie. Przy zastosowaniu Open Epi (www.openepi.com), bezpłatnego i otwartego oprogramowania przeznaczonego do analizy statystycznej, obliczyłam dla polimorfizmu rs1800796 w dominującym modelu dziedziczenia allele -572C minimalną wielkość próby dla 80% mocy statystycznej i 5% współczynnika błędu typu I (α) i przy założeniach, że stosunek liczebności grupy kontrolnej do liczebności grupy z bliznowcem wynosi 1.16 (100/86), a odsetki osób z co najmniej jednym allele -572C są takie jak w mojej rozprawie tj. 12% w grupie kontrolnej i 18.6% w grupie kontrolnej. Przy powyższych założeniach obliczony

przedział ufności dla wymaganej (minimalnej) wielkości próby wyniósł od 918 do 983 osób, w tym od 425 do 455 pacjentów z bliznowcem.

6. Wnioski

1. Analizowane pojedynczo polimorfizmy rs1800797, rs1800796 i rs1800795 genu *IL6* i polimorfizm rs2228145 genu *IL6R* nie predysponują do bliznowca w badanej grupie Polaków.
2. Haplotypy rs1800797-rs1800796-rs1800795 genu *IL6* nie wiążą się z wyższym ryzykiem bliznowca w badanej grupie Polaków.

7. Streszczenie

Bliznowiec jest łagodnym fibroproliferacyjnym przerostem blizny, przekraczającym jej pierwotną granicę z zajęciem zdrowej skóry. Jak dotąd, etiologia bliznowców i patomechanizm ich powstawania nie zostały do końca poznane. Powstawanie bliznowca jest złożonym procesem zależnym od wielu czynników, wśród których wymienia się m.in. zaburzenia czynności układu immunologicznego, w tym nadmierną aktywność ścieżki sygnalizacyjnej interleukiny 6 (IL6) oraz podatność genetyczną.

Stąd też celem mojej rozprawy była ocena związku polimorfizmów rs1800797, rs1800796 i rs1800795 promotora genu *IL6* kodującego interleukinę 6 i polimorfizmu rs2228145 genu *IL6R* kodującego receptor dla interleukiny 6 z predyspozycją do bliznowca u Polaków.

Polimorfizmy genetyczne identyfikowano metodą PCR-RFLP (warianty *IL6*) lub poprzez sekwencjonowanie (polimorfizm *IL6R*) w próbkach genomowego DNA wyekstrahowanego z leukocytów krwi obwodowej 86 dorosłych pacjentów z bliznowcem oraz z leukocytów krwi pępowinowej 100 noworodków stanowiących grupę kontrolną.

Nie stwierdzono istotnych różnic w rozkładzie alleli, genotypów i haplotypów *IL6* pomiędzy pacjentami z bliznowcem i noworodkami z grupy kontrolnej. Nie stwierdzono również istotnych różnic pomiędzy obiema grupami w rozkładzie alleli i genotypów rs2228145 *IL6R*.

Wnioski:

1. Polimorfizmy rs1800797, rs1800796 i rs1800795 w promotorze genu *IL6* kodującego interleukinę 6 oraz polimorfizm rs2228145 w genie *IL6R* kodującym receptor IL6 nie predysponują do bliznowca w badanej grupie Polaków.
2. Haplotypy rs1800797-rs1800796-rs1800795 *IL6* nie wiążą się z wyższym ryzykiem wystąpienia bliznowca w badanej grupie Polaków.

8. Abstract

Keloid is a benign fibroproliferative hypertrophy of the scar, that extends outside the original wound and invades adjacent healthy skin. So far, the etiology of keloids and the pathomechanism of their formation have not been fully understood. The formation of the keloid is a complex process dependent on many factors, among which are e.g. immune system disorders including overactivity of the interleukin 6 (IL6) signaling pathway, and genetic susceptibility.

Therefore, the aim of my study was to investigate the association of rs1800797, rs1800796 i rs1800795 polymorphisms in the promoter of *IL6* gene encoding interleukin 6 and rs2228145 polymorphism in the *IL6R* gene encoding IL6 receptor with the predisposition to keloid in Polish patients.

The genetic polymorphisms were identified either by PCR-RFLP method (*IL6* variants) or by sequencing (*IL6R* polymorphism) in the samples of genomic DNA extracted from peripheral blood leukocytes from 86 adult patients with keloid and from cord blood leukocytes of 100 newborns consisting a control group

No significant differences in the distributions of *IL6* alleles, genotypes and haplotypes were found between keloid patients and newborn controls. There were also no significant differences between both groups in the distribution of rs2228145 *IL6R* alleles and genotypes.

Conclusions:

1. The rs1800797, rs1800796 and rs1800795 polymorphisms in the promoter of *IL6* gene encoding interleukin 6 and rs2228145 polymorphism in the *IL6R* gene encoding IL6 receptor do not predispose to keloid in the study group of Poles.

2. The rs1800797-rs1800796-rs1800795 *IL6* haplotypes are not associated with a higher risk of keloid in the studied group of Poles.

9. Piśmiennictwo

- 1.** Pastuszek-Gabinowska M, Peregud-Pogorzelski J, Łuksza K, Szelewski P, Brodkiewicz A. Wybrane aspekty molekularnych podstaw tworzenia się bliznowców [Some aspects of molecular bases of keloid formation]. *Ann Acad Med Stetin.* 2011;57(2):10-7.
- 2.** Isaacs D. Szczepienia. Odkrycia medyczne, które zmieniły świat. Wydawnictwo Bo.wiem, 2022.
- 3.** Breasted JH. The Edwin Smith Surgical Papyrus, Volume 1: Hieroglyphic Transliteration, Translation, and Commentary. Oriental Institute Publications 3, The University of Chicago Press, Chicago, 1930.
- 4.** Sand M, Sand D, Brors D, Altmeyer P, Mann B, Bechara FG. Cutaneous lesions of the external ear. *Head Face Med.* 2008 Feb 8;4:2. doi: 10.1186/1746-160X-4-2.
- 5.** Retz, N. Traite des Maladies de la Peau et de celles de l'Esprit. Mequignon, Paris, 1790, 155.
- 6.** Alibert, JLM. Note sur la keloide. *J Univ Sci Med,* 1816, 2.2: 207-216.
- 7.** Antończak P, Jurzak M, Adamczyk K, Garnarczyk A. Wybrane molekularne aspekty procesu fibroproliferacyjnego w przebiegu keloidów. *Przegląd Dermatol* 2015, 102, 253-262.
- 8.** Nkemcho O. , Ambadasu B., Uma G., Andrew LF., Keloids: Current and emerging therapies, *Scars, Burns & Healing* 2020; 6: 1-18
- 9.** Shih B., Bayat A.: Genetics of keloid scarring. *Arch Dermatol Res.* 2010, 302 (5), 319–339.
- 10.** Chike-Obi C.J., Cole P.D., Brissett A.E.: Keloids: pathogenesis, clinical features, and management. *Semin Plast Surg.* 2009, 23 (3), 178–184.

11. Smith J.C., Boone B.E., Opalenik S.R., Williams S.M., Russell S.B.: Gene profiling of keloid fibroblasts shows altered expression in multiple fibrosis-associated pathways. *J Invest Dermatol.* 2008, 128 (5), 1298–1310.
12. Clark J.A., Turner M.L., Howard L., Stanescu H., Kleta R., Kopp J.B.: Description of familial keloids in five pedigrees: evidence for autosomal dominant inheritance and phenotypic heterogeneity. *BMC Dermatol.* 2009, 9, 8
13. Kelly A.P.: Update on the management of keloids. *Semin Cutan Med Surg.* 2009, 28 (2), 71–76.
14. Gupta M., Narang T.: Role of mitomycin C in reducing keloid recurrence: patient series and literature review. *J Laryngol Otol.* 2011, 125 (3), 297–300.
15. Baisch A., Riedel F., Hyperplastic scars and keloids: Part I: Basics and prevention 2006; *HNO* 54: 893-905.
16. Bran GM, Goessler UR, Hormann K, Riedel F, Sadick H. Keloids: current concepts of pathogenesis (review). *Int J Mol Med.* 2009 Sep;24(3):283-93. doi: 10.3892/ijmm_00000231.
17. Zhang S, Liu B, Wang W, Lv L, Gao D, Chai M, Li M, Wu Z, Zhu Y, Ma J, Leng L. The "Matrisome" reveals the characterization of skin keloid microenvironment. *FASEB J.* 2021 Apr;35(4):e21237. doi: 10.1096/fj.202001660RR.
18. Andrews JP, Marttala J, Macarak E, Rosenbloom J, Uitto J. Keloids: The paradigm of skin fibrosis - Pathomechanisms and treatment. *Matrix Biol.* 2016 Apr;51:37-46. doi: 10.1016/j.matbio.2016.01.013.
19. Ghazizadeh M, Tosa M, Shimizu H, Hyakusoku H, Kawanami O. Functional implications of the IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2007 Jan;127(1):98-105. doi: 10.1038/sj.jid.5700564.

- 20.** Ghazizadeh M. Essential role of IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J Nippon Med Sch.* 2007 Feb;74(1):11-22. doi: 10.1272/jnms.74.11.
- 21.** Witmanowski H, Lewandowicz E, Zieliński T, Łuczowska M, Kruk-Jeromi J. Blizny przerostowe i keloidy Część I. Patogeneza i patomechanizm powstawania Hypertrophic scars and keloids Part I. Pathogenesis and pathomechanism. *Post Dermatol Alergol* 2008; 25: 107–115.
- 22.** Cho JW, Il KJ, Lee KS. Downregulation of type I collagen expression in silibinin-treated human skin fibroblasts by blocking the activation of Smad2/3-dependent signaling pathways: potential therapeutic use in the chemoprevention of keloids. *Int J Mol Med.* 2013 May;31(5):1148-52. doi: 10.3892/ijmm.2013.1303.
- 23.** Cui J, Jin S, Jin C, Jin Z. Syndecan-1 regulates extracellular matrix expression in keloid fibroblasts via TGF- β 1/Smad and MAPK signaling pathways. *Life Sci.* 2020 Aug 1;254:117326. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117326. Epub 2020 Jan 15. PMID: 31954164.
- 24.** Wang XM, Liu XM, Wang Y, Chen ZY. Activating transcription factor 3 (ATF3) regulates cell growth, apoptosis, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblast through transforming growth factor beta (TGF-beta)/SMAD signaling pathway. *Bioengineered.* 2021 Dec;12(1):117-126. doi: 10.1080/21655979.2020.1860491.
- 25.** Yao X, Cui X, Wu X, Xu P, Zhu W, Chen X, Zhao T. Tumor suppressive role of miR-1224-5p in keloid proliferation, apoptosis and invasion via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Jan 1;495(1):713-720. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.070.
- 26.** Li T, Zhao J. Knockdown of eIF3a inhibits TGF- β 1-induced extracellular matrix protein expression in keloid fibroblasts. *Mol Med Rep.* 2018 Mar;17(3):4057-4061. doi: 10.3892/mmr.2017.8365.

- 27.** Zhu XJ, Li WZ, Li H, Fu CQ, Liu J. Association of interleukin-6 gene polymorphisms and circulating levels with keloid scars in a Chinese Han population. *Genet Mol Res.* 2017 Apr 20;16(2). doi: 10.4238/gmr16029110.
- 28.** Szmyrka-Kaczmarek M, Wiland P. Tocilizumab – inhibitor receptora interleukiny 6 – nowa opcja terapeutyczna w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* 2009; 47, 2: 85–94.
- 29.** Garbers C, Monhasery N, Aparicio-Siegmund S, Lokau J, Baran P, Nowell MA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Sep;1842(9):1485-94. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.05.018.
- 30.** Tosa M, Ghazizadeh M, Shimizu H, Hirai T, Hyakusoku H, Kawanami O. Global gene expression analysis of keloid fibroblasts in response to electron beam irradiation reveals the involvement of interleukin-6 pathway. *J Invest Dermatol.* 2005 Apr;124(4):704-13. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23592.x.
- 31.** Tan PL, Farmiloe S, Yeoman S, Watson JD. Expression of the interleukin 6 gene in rheumatoid synovial fibroblasts. *J Rheumatol.* 1990 Dec;17(12):1608-12.
- 32.** Feghali CA, Bost KL, Boulware DW, Levy LS. Control of IL-6 expression and response in fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 1994;17(4):309-18. doi: 10.3109/08916939409010671.
- 33.** Shahar I, Fireman E, Topilsky M, Grief J, Kivity S, Spierer Z, Ben Efraim S. Effect of IL-6 on alveolar fibroblast proliferation in interstitial lung diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996 Jun;79(3):244-51. doi: 10.1006/clin.1996.0075.
- 34.** Szpakowicz A, Pepinski W, Waszkiewicz E, Skawronska M, Niemcunowicz-Janica A, Musial WJ, Kaminski KA. The rs2228145 polymorphism in the interleukin-6

receptor and its association with long-term prognosis after myocardial infarction in a pilot study. *Arch Med Sci.* 2017 Feb 1;13(1):93-99. doi: 10.5114/aoms.2016.58636.

35. Uitto J. IL-6 signaling pathway in keloids: a target for pharmacologic intervention? *J Invest Dermatol.* 2007 Jan;127(1):6-8. doi: 10.1038/sj.jid.5700604.

36. Liu S, Yang H, Song J, Zhang Y, Abualhssain ATH, Yang B. Keloid: Genetic susceptibility and contributions of genetics and epigenetics to its pathogenesis. *Exp Dermatol.* 2022 Nov;31(11):1665-1675. doi: 10.1111/exd.14671.

37. Lu WS, Wang JF, Yang S, Xiao FL, Quan C, Cheng H, Wang PG, Zhang AP, Cai LQ, Zhang XJ. Association of HLA-DQA1 and DQB1 alleles with keloids in Chinese Hans. *J Dermatol Sci.* 2008 Nov;52(2):108-17. doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.04.010.

38. Brown JJ, Ollier WE, Thomson W, Bayat A. Positive association of HLA-DRB1*15 with keloid disease in Caucasians. *Int J Immunogenet.* 2008 Aug;35(4-5):303-7. doi: 10.1111/j.1744-313X.2008.00780.x.

39. Shih B, Bayat A. Comparative genomic hybridisation analysis of keloid tissue in Caucasians suggests possible involvement of HLA-DRB5 in disease pathogenesis. *Arch Dermatol Res.* 2012 Apr;304(3):241-9. doi: 10.1007/s00403-011-1182-4.

40. Brown JJ, Ollier WE, Arscott G, Bayat A. Association of HLA-DRB1* and keloid disease in an Afro-Caribbean population. *Clin Exp Dermatol.* 2010 Apr;35(3):305-10. doi: 10.1111/j.1365-2230.2009.03506.x.

41. Brown J.J., Bayat A.: Genetic susceptibility to raised dermal scarring. *Br J Dermatol.* 2009, 161 (1), 8–18.

42. Char F.: Ehlers-Danlos syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1971, 7 (8), 300–302.

43. Pope F.M., Martin G.R., McKusick V.A.: Inheritance of Ehlers-Danlos type IV syndrome. *J Med Genet.* 1977, 14 (3), 200–204.

- 44.** Goeminne L.: A new probably X-linked inherited syndrome: congenital muscular torticollis, multiple keloids cryptorchidism and renal dysplasia. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1968, 17 (3), 439–467.
- 45.** Siraganian P.A., Rubinstein J.H., Miller R.W.: Keloids and neoplasms in the Rubinstein-Taybi syndrome. *Med Pediatr Oncol*. 1989, 17 (6), 485–491.
- 46.** Hambrick G.W. Jr, Carter D.M.: Pachydermoperiostosis. Touraine-Solente-Golé syndrome. *Arch Dermatol*. 1966, 94 (5), 594–607.
- 47.** Marneros AG, Norris JE, Watanabe S, Reichenberger E, Olsen BR. Genome scans provide evidence for keloid susceptibility loci on chromosomes 2q23 and 7p11. *J Invest Dermatol*. 2004 May;122(5):1126-32. doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.22327.x.
- 48.** Chen Y, Gao JH, Liu XJ, Yan X, Song M. [Linkage analysis of keloid susceptibility loci on chromosome 7p11 in a Chinese pedigree]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2006 May;26(5):623-5, 637.
- 49.** Chen Y, Gao JH, Yan X, Song M, Liu XJ. [Location of predisposing gene for one Han Chinese keloid pedigree]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2007 Mar;23(2):137-40.
- 50.** Yan X, Gao JH, Chen Y, Song M, Liu XJ. [Preliminary linkage analysis and mapping of keloid susceptibility locus in a Chinese pedigree]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 2007 Jan;23(1):32-5.
- 51.** Sakaue S, Kanai M, Tanigawa Y, Karjalainen J, Kurki M, Koshiba S, Narita A, Konuma T, Yamamoto K, Akiyama M, Ishigaki K, Suzuki A, Suzuki K, Obara W, Yamaji K, Takahashi K, Asai S, Takahashi Y, Suzuki T, Shinozaki N, Yamaguchi H, Minami S, Murayama S, Yoshimori K, Nagayama S, Obata D, Higashiyama M, Masumoto A, Koretsune Y; FinnGen; Ito K, Terao C, Yamauchi T, Komuro I, Kadowaki T, Tamiya G, Yamamoto M, Nakamura Y, Kubo M, Murakami Y,

Yamamoto K, Kamatani Y, Palotie A, Rivas MA, Daly MJ, Matsuda K, Okada Y. A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes. *Nat Genet.* 2021 Oct;53(10):1415-1424. doi: 10.1038/s41588-021-00931-x.

52. Ishigaki K, Akiyama M, Kanai M, Takahashi A, Kawakami E, Sugishita H, Sakaue S, Matoba N, Low SK, Okada Y, Terao C, Amariuta T, Gazal S, Kochi Y, Horikoshi M, Suzuki K, Ito K, Koyama S, Ozaki K, Niida S, Sakata Y, Sakata Y, Kohno T, Shiraishi K, Momozawa Y, Hirata M, Matsuda K, Ikeda M, Iwata N, Ikegawa S, Kou I, Tanaka T, Nakagawa H, Suzuki A, Hirota T, Tamari M, Chayama K, Miki D, Mori M, Nagayama S, Daigo Y, Miki Y, Katagiri T, Ogawa O, Obara W, Ito H, Yoshida T, Imoto I, Takahashi T, Tanikawa C, Suzuki T, Sinozaki N, Minami S, Yamaguchi H, Asai S, Takahashi Y, Yamaji K, Takahashi K, Fujioka T, Takata R, Yanai H, Masumoto A, Koretsune Y, Kutsumi H, Higashiyama M, Murayama S, Minegishi N, Suzuki K, Tanno K, Shimizu A, Yamaji T, Iwasaki M, Sawada N, Uemura H, Tanaka K, Naito M, Sasaki M, Wakai K, Tsugane S, Yamamoto M, Yamamoto K, Murakami Y, Nakamura Y, Raychaudhuri S, Inazawa J, Yamauchi T, Kadowaki T, Kubo M, Kamatani Y. Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. *Nat Genet.* 2020 Jul;52(7):669-679. doi: 10.1038/s41588-020-0640-3.

53. Nakashima M, Chung S, Takahashi A, Kamatani N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Hosono N, Kubo M, Nakamura Y, Zembutsu H. A genome-wide association study identifies four susceptibility loci for keloid in the Japanese population. *Nat Genet.* 2010 Sep;42(9):768-71. doi: 10.1038/ng.645.

54. Teng G, Liu C, Chen M, Ma K, Liang L, Yan T. Differential susceptible loci expression in keloid and hypertrophic scars in the Chinese Han population. *Ann Plast Surg.* 2015 Jan;74(1):26-9. doi: 10.1097/SAP.0000000000000364.

- 55.** Tosa M, Watanabe A, Ghazizadeh M. IL-6 Polymorphism and Susceptibility to Keloid Formation in a Japanese Population. *J Invest Dermatol.* 2016 May;136(5):1069-1072. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.019.
- 56.** Zhu F, Wu B, Li P, Wang J, Tang H, Liu Y, Zuo X, Cheng H, Ding Y, Wang W, Zhai Y, Qian F, Wang W, Yuan X, Wang J, Ha W, Hou J, Zhou F, Wang Y, Gao J, Sheng Y, Sun L, Liu J, Yang S, Zhang X. Association study confirmed susceptibility loci with keloid in the Chinese Han population. *PLoS One.* 2013 May 7;8(5):e62377. doi: 10.1371/journal.pone.0062377.
- 57.** Zhao Y, Liu SL, Xie J, Ding MQ, Lu MZ, Zhang LF, Yao XH, Hu B, Lu WS, Zheng XD. NEDD4 single nucleotide polymorphism rs2271289 is associated with keloids in Chinese Han population. *Am J Transl Res.* 2016 Feb 15;8(2):544-55.
- 58.** Abdu Allah AMK, Mohammed KI, Farag AGA, Hagag MM, Essam M, Tayel NR. Interleukin-6 serum level and gene polymorphism in keloid patients. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2019 Jun 30;65(5):43-48..
- 59.** Velez Edwards DR, Tsosie KS, Williams SM, Edwards TL, Russell SB. Admixture mapping identifies a locus at 15q21.2-22.3 associated with keloid formation in African Americans. *Hum Genet.* 2014 Dec;133(12):1513-23. doi: 10.1007/s00439-014-1490-9.
- 60.** Wu Y, Wang B, Li YH, Xu XG, Luo YJ, Chen JZ, Wei HC, Gao XH, Chen HD. Meta-analysis demonstrates association between Arg72Pro polymorphism in the P53 gene and susceptibility to keloids in the Chinese population. *Genet Mol Res.* 2012 Jun 29;11(2):1701-11. doi: 10.4238/2012.June.29.2.
- 61.** Dmytrzak A, Boroń A, Łoniewska B, Lewandowska K, Gorący I, Kaczmarczyk M, Ciechanowicz A. Two Functional *TP53* Genetic Variants and Predisposition to Keloid Scarring in Caucasians. *Dermatol Res Pract.* 2019 Nov 13;2019:6179063. doi: 10.1155/2019/6179063.

- 62.** Emami A, Halim AS, Salahshourifar I, Yussof SJ, Khoo TL, Kannan TP. Association of TGF β 1 and SMAD4 variants in the etiology of keloid scar in the Malay population. *Arch Dermatol Res.* 2012 Sep;304(7):541-7. doi: 10.1007/s00403-012-1262-0.
- 63.** Rivera-Chavez FA, Peters-Hybki DL, Barber RC, O'Keefe GE. Interleukin-6 promoter haplotypes and interleukin-6 cytokine responses. *Shock.* 2003 Sep;20(3):218-23. doi: 10.1097/01.shk.0000079425.52617.db.
- 64.** Nash D, Hughes MG, Butcher L, Aicheler R, Smith P, Cullen T, Webb R. IL-6 signaling in acute exercise and chronic training: Potential consequences for health and athletic performance. *Scand J Med Sci Sports.* 2023 Jan;33(1):4-19. doi: 10.1111/sms.14241.
- 65.** Lokau J, Agthe M, Garbers C. Generation of soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 receptors: a crucial function for proteases during inflammation. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 1- 10. doi:10.1155/2016/1785021.
- 66.** Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1399-406. doi: 10.1084/jem.183.4.1399.
- 67.** Esparza-Gordillo J, Schaarschmidt H, Liang L, Cookson W, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, Nemat K, Henderson J, Paternoster L, Harper JJ, Mangold E, Nothen MM, Rüschenhoff F, Kerscher T, Marenholz I, Matanovic A, Lau S, Keil T, Bauer CP, Kurek M, Ciechanowicz A, Macek M, Franke A, Kabesch M, Hubner N, Abecasis G, Weidinger S, Moffatt M, Lee YA. A functional IL-6 receptor (IL6R) variant is a risk

factor for persistent atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Aug;132(2):371-7. doi: 10.1016/j.jaci.2013.01.057.

68. Müllberg J, Oberthür W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*. 1994 May 15;152(10):4958-68.

69. Galicia JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H. Polymorphisms in the IL-6 receptor (IL-6R) gene: strong evidence that serum levels of soluble IL-6R are genetically influenced. *Genes Immun*. 2004 Sep;5(6):513-6. doi: 10.1038/sj.gene.6364120.

70. Ridker PM, Pare G, Parker A, Zee RY, Danik JS, Buring JE, Kwiatkowski D, Cook NR, Miletich JP, Chasman DI. Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. *Am J Hum Genet*. 2008 May;82(5):1185-92. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.03.015.

71. Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol*. 2017 Apr 21;8:405. doi: 10.3389/fimmu.2017.00405.

72. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986 Nov 6-12;324(6092):73-6. doi: 10.1038/324073a0.

73. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*. 1998;16(3-4):249-84. doi: 10.3109/08830189809042997.

- 74.** Luo Y, Zheng SG. Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6 Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms. *Front Immunol.* 2016 Dec 19;7:604. doi: 10.3389/fimmu.2016.00604.
- 75.** Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 Jun;23(3):85-97. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.04.001.
- 76.** Kallinich T. Regulating against the dysregulation: new treatment options in autoinflammation. *Semin Immunopathol.* 2015 Jul;37(4):429-37. doi: 10.1007/s00281-015-0501-9.
- 77.** Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J.* 1994 Jun 1;300 (Pt 2)(Pt 2):281-90. doi: 10.1042/bj3000281.
- 78.** Isshiki H, Akira S, Tanabe O, Nakajima T, Shimamoto T, Hirano T, Kishimoto T. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol.* 1990 Jun;10(6):2757-64. doi: 10.1128/mcb.10.6.2757-2764.1990.
- 79.** Edbrooke MR, Burt DW, Cheshire JK, Woo P. Identification of cis-acting sequences responsible for phorbol ester induction of human serum amyloid A gene expression via a nuclear factor kappaB-like transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1989 May;9(5):1908-16. doi: 10.1128/mcb.9.5.1908-1916.1989.
- 80.** Walther Z, May LT, Sehgal PB. Transcriptional regulation of the interferon-beta 2/B cell differentiation factor BSF-2/hepatocyte-stimulating factor gene in human fibroblasts by other cytokines. *J Immunol.* 1988 Feb 1;140(3):974-7.
- 81.** Dendorfer U, Oettgen P, Libermann TA. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and

- lipopolysaccharide. *Mol Cell Biol.* 1994 Jul;14(7):4443-54. doi: 10.1128/mcb.14.7.4443-4454.1994.
- 82.** Sehgal PB. Regulation of IL6 gene expression. *Res Immunol.* 1992 Sep;143(7):724-34. doi: 10.1016/0923-2494(92)80011-9.
- 83.** Akira S, Isshiki H, Nakajima T, Kinoshita S, Nishio Y, Natsuka S, Kishimoto T. Regulation of expression of the interleukin 6 gene: structure and function of the transcription factor NF-IL6. *Ciba Found Symp.* 1992;167:47-62; discussion 62-7. doi: 10.1002/9780470514269.ch4.
- 84.** Ray A, Sassone-Corsi P, Sehgal PB. A multiple cytokine- and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with c-fos gene regulation. *Mol Cell Biol.* 1989 Dec;9(12):5537-47. doi: 10.1128/mcb.9.12.5537-5547.1989.
- 85.** Grassl C, Luckow B, Schlöndorff D, Dendorfer U. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Jul;10(7):1466-77. doi: 10.1681/ASN.V1071466.
- 86.** Vales LD, Friedl EM. Binding of C/EBP and RBP (CBF1) to overlapping sites regulates interleukin-6 gene expression. *J Biol Chem.* 2002 Nov 8;277(45):42438-46. doi: 10.1074/jbc.M207363200.
- 87.** Kannabiran C, Zeng X, Vales LD. The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) regulates interleukin-6 gene expression. *Mol Cell Biol.* 1997 Jan;17(1):1-9. doi: 10.1128/MCB.17.1.1.
- 88.** Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18138-44. doi: 10.1074/jbc.M000379200..

- 89.** Demirturk F, Ates O, Gunal O, Bozkurt N, Aysal T, Nacar MC. IL-6 gene promoter polymorphisms: genetic susceptibility to recurrent pregnancy loss. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(8):479-82. doi: 10.4149/bll_2014_092..
- 90.** Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998 Oct 1;102(7):1369-76. doi: 10.1172/JCI2629.
- 91.** von Linsingen R, Bompeixe EP, Bicalho Mda G. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. *Am J Reprod Immunol*. 2005 Feb;53(2):94-9. doi: 10.1111/j.1600-0897.2005.00250.x.
- 92.** Tumu VR, Govatati S, Guruvaiah P, Deenadayal M, Shivaji S, Bhanoori M. An interleukin-6 gene promoter polymorphism is associated with polycystic ovary syndrome in South Indian women. *J Assist Reprod Genet*. 2013 Dec;30(12):1541-6. doi: 10.1007/s10815-013-0111-1.
- 93.** Valette K, Li Z, Bon-Baret V, Chignon A, Bérubé JC, Eslami A, Lamothe J, Gaudreault N, Joubert P, Obeidat M, van den Berge M, Timens W, Sin DD, Nickle DC, Hao K, Labbé C, Godbout K, Côté A, Laviolette M, Boulet LP, Mathieu P, Thériault S, Bossé Y. Prioritization of candidate causal genes for asthma in susceptibility loci derived from UK Biobank. *Commun Biol*. 2021 Jun 8;4(1):700. doi: 10.1038/s42003-021-02227-6.
- 94.** Han Y, Jia Q, Jahani PS, Hurrell BP, Pan C, Huang P, Gukasyan J, Woodward NC, Eskin E, Gilliland FD, Akbari O, Hartiala JA, Allayee H. Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun*. 2020 Apr 15;11(1):1776. doi: 10.1038/s41467-020-15649-3.

95. Olafsdottir TA, Theodors F, Bjarnadottir K, Bjornsdottir US, Agustsdottir AB, Stefansson OA, Ivarsdottir EV, Sigurdsson JK, Benonisdottir S, Eyjolfsson GI, Gislason D, Gislason T, Guðmundsdóttir S, Gylfason A, Halldorsson BV, Halldorsson GH, Juliusdottir T, Kristinsdottir AM, Ludviksdottir D, Ludviksson BR, Masson G, Norland K, Onundarson PT, Olafsson I, Sigurdardottir O, Stefansdottir L, Sveinbjornsson G, Tragante V, Gudbjartsson DF, Thorleifsson G, Sulem P, Thorsteinsdottir U, Norddahl GL, Jonsdottir I, Stefansson K. Eighty-eight variants highlight the role of T cell regulation and airway remodeling in asthma pathogenesis. *Nat Commun.* 2020 Jan 20;11(1):393. doi: 10.1038/s41467-019-14144-8.

96. Langefeld CD, Ainsworth HC, Cunninghame Graham DS, Kelly JA, Comeau ME, Marion MC, Howard TD, Ramos PS, Croker JA, Morris DL, Sandling JK, Almlöf JC, Acevedo-Vásquez EM, Alarcón GS, Babini AM, Baca V, Bengtsson AA, Berbotto GA, Bijl M, Brown EE, Brunner HI, Cardiel MH, Catoggio L, Cervera R, Cucho-Venegas JM, Dahlqvist SR, D'Alfonso S, Da Silva BM, de la Rúa Figueroa I, Doria A, Edberg JC, Endreffy E, Esquivel-Valerio JA, Fortin PR, Freedman BI, Frostegård J, García MA, de la Torre IG, Gilkeson GS, Gladman DD, Gunnarsson I, Guthridge JM, Huggins JL, James JA, Kallenberg CGM, Kamen DL, Karp DR, Kaufman KM, Kottyan LC, Kovács L, Laustrop H, Lauwerys BR, Li QZ, Maradiaga-Ceceña MA, Martín J, McCune JM, McWilliams DR, Merrill JT, Miranda P, Moctezuma JF, Nath SK, Niewold TB, Orozco L, Ortego-Centeno N, Petri M, Pineau CA, Pons-Estel BA, Pope J, Raj P, Ramsey-Goldman R, Reveille JD, Russell LP, Sabio JM, Aguilar-Salinas CA, Scherbarth HR, Scorza R, Seldin MF, Sjöwall C, Svenungsson E, Thompson SD, Toloza SMA, Truedsson L, Tusié-Luna T, Vasconcelos C, Vilá LM, Wallace DJ, Weisman MH, Wither JE, Bhangale T, Oksenberg JR, Rioux JD, Gregersen PK, Syvänen AC, Rönnblom L, Criswell LA, Jacob CO, Sivils KL, Tsao BP, Schanberg LE,

Behrens TW, Silverman ED, Alarcón-Riquelme ME, Kimberly RP, Harley JB, Wakeland EK, Graham RR, Gaffney PM, Vyse TJ. Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus. *Nat Commun.* 2017 Jul 17;8:16021. doi: 10.1038/ncomms16021.

97. Langefeld CD, Ainsworth HC, Cunninghame Graham DS, Kelly JA, Comeau ME, Marion MC, Howard TD, Ramos PS, Croker JA, Morris DL, Sandling JK, Almlöf JC, Acevedo-Vásquez EM, Alarcón GS, Babini AM, Baca V, Bengtsson AA, Berbotto GA, Bijl M, Brown EE, Brunner HI, Cardiel MH, Catoggio L, Cervera R, Cucho-Venegas JM, Dahlqvist SR, D'Alfonso S, Da Silva BM, de la Rúa Figueroa I, Doria A, Edberg JC, Endreffy E, Esquivel-Valerio JA, Fortin PR, Freedman BI, Frostegård J, García MA, de la Torre IG, Gilkeson GS, Gladman DD, Gunnarsson I, Guthridge JM, Huggins JL, James JA, Kallenberg CGM, Kamen DL, Karp DR, Kaufman KM, Kottyan LC, Kovács L, Laustrup H, Lauwerys BR, Li QZ, Maradiaga-Ceceña MA, Martín J, McCune JM, McWilliams DR, Merrill JT, Miranda P, Moctezuma JF, Nath SK, Niewold TB, Orozco L, Ortego-Centeno N, Petri M, Pineau CA, Pons-Estel BA, Pope J, Raj P, Ramsey-Goldman R, Reveille JD, Russell LP, Sabio JM, Aguilar-Salinas CA, Scherbarth HR, Scorza R, Seldin MF, Sjöwall C, Svenungsson E, Thompson SD, Toloza SMA, Truedsson L, Tusié-Luna T, Vasconcelos C, Vilá LM, Wallace DJ, Weisman MH, Wither JE, Bhangale T, Oksenberg JR, Rioux JD, Gregersen PK, Syvänen AC, Rönnblom L, Criswell LA, Jacob CO, Sivils KL, Tsao BP, Schanberg LE, Behrens TW, Silverman ED, Alarcón-Riquelme ME, Kimberly RP, Harley JB, Wakeland EK, Graham RR, Gaffney PM, Vyse TJ. Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus. *Nat Commun.* 2017 Jul 17;8:16021. doi: 10.1038/ncomms16021.

98. Evangelou E, Warren HR, Mosen-Ansorena D, Mifsud B, Pazoki R, Gao H, Ntritsos G, Dimou N, Cabrera CP, Karaman I, Ng FL, Evangelou M, Witkowska K, Tzani E, Hellwege JN, Giri A, Velez Edwards DR, Sun YV, Cho K, Gaziano JM, Wilson PWF, Tsao PS, Kovesdy CP, Esko T, Mägi R, Milani L, Almgren P, Boutin T, Debette S, Ding J, Giulianini F, Holliday EG, Jackson AU, Li-Gao R, Lin WY, Luan J, Mangino M, Oldmeadow C, Prins BP, Qian Y, Sargurupremraj M, Shah N, Surendran P, Thériault S, Verweij N, Willems SM, Zhao JH, Amouyel P, Connell J, de Mutsert R, Doney ASF, Farrall M, Menni C, Morris AD, Noordam R, Paré G, Poulter NR, Shields DC, Stanton A, Thom S, Abecasis G, Amin N, Arking DE, Ayers KL, Barbieri CM, Batini C, Bis JC, Blake T, Bochud M, Boehnke M, Boerwinkle E, Boomsma DI, Bottinger EP, Braund PS, Brumat M, Campbell A, Campbell H, Chakravarti A, Chambers JC, Chauhan G, Ciullo M, Cocca M, Collins F, Cordell HJ, Davies G, de Borst MH, de Geus EJ, Deary IJ, Deelen J, Del Greco M F, Demirkale CY, Dörr M, Ehret GB, Elosua R, Enroth S, Erzurumluoglu AM, Ferreira T, Frånberg M, Franco OH, Gandin I, Gasparini P, Giedraitis V, Gieger C, Girotto G, Goel A, Gow AJ, Gudnason V, Guo X, Gyllensten U, Hamsten A, Harris TB, Harris SE, Hartman CA, Havulinna AS, Hicks AA, Hofer E, Hofman A, Hottenga JJ, Huffman JE, Hwang SJ, Ingelsson E, James A, Jansen R, Jarvelin MR, Joehanes R, Johansson Å, Johnson AD, Joshi PK, Jousilahti P, Jukema JW, Jula A, Kähönen M, Kathiresan S, Keavney BD, Khaw KT, Knekt P, Knight J, Kolcic I, Kooner JS, Koskinen S, Kristiansson K, Kutalik Z, Laan M, Larson M, Launer LJ, Lehne B, Lehtimäki T, Liewald DCM, Lin L, Lind L, Lindgren CM, Liu Y, Loos RJF, Lopez LM, Lu Y, Lyytikäinen LP, Mahajan A, Mamasoula C, Marrugat J, Marten J, Milanesechi Y, Morgan A, Morris AP, Morrison AC, Munson PJ, Nalls MA, Nandakumar P, Nelson CP, Niiranen T, Nolte IM, Nutile T, Oldehinkel AJ, Oostra BA, O'Reilly PF, Org E, Padmanabhan S, Palmas W, Palotie A,

Pattie A, Penninx BWJH, Perola M, Peters A, Polasek O, Pramstaller PP, Nguyen QT, Raitakari OT, Ren M, Rettig R, Rice K, Ridker PM, Ried JS, Riese H, Ripatti S, Robino A, Rose LM, Rotter JI, Rudan I, Ruggiero D, Saba Y, Sala CF, Salomaa V, Samani NJ, Sarin AP, Schmidt R, Schmidt H, Shrine N, Siscovick D, Smith AV, Snieder H, Söber S, Sorice R, Starr JM, Stott DJ, Strachan DP, Strawbridge RJ, Sundström J, Swertz MA, Taylor KD, Teumer A, Tobin MD, Tomaszewski M, Toniolo D, Traglia M, Trompet S, Tuomilehto J, Tzourio C, Uitterlinden AG, Vaez A, van der Most PJ, van Duijn CM, Vergnaud AC, Verwoert GC, Vitart V, Völker U, Vollenweider P, Vuckovic D, Watkins H, Wild SH, Willemsen G, Wilson JF, Wright AF, Yao J, Zemunik T, Zhang W, Attia JR, Butterworth AS, Chasman DI, Conen D, Cucca F, Danesh J, Hayward C, Howson JMM, Laakso M, Lakatta EG, Langenberg C, Melander O, Mook-Kanamori DO, Palmer CNA, Risch L, Scott RA, Scott RJ, Sever P, Spector TD, van der Harst P, Wareham NJ, Zeggini E, Levy D, Munroe PB, Newton-Cheh C, Brown MJ, Metspalu A, Hung AM, O'Donnell CJ, Edwards TL, Psaty BM, Tzoulaki I, Barnes MR, Wain LV, Elliott P, Caulfield MJ; Million Veteran Program. Genetic analysis of over 1 million people identifies 535 new loci associated with blood pressure traits. *Nat Genet.* 2018 Oct;50(10):1412-1425. doi: 10.1038/s41588-018-0205-x. Epub 2018 Sep 17. Erratum in: *Nat Genet.* 2018 Dec;50(12):1755.

99. Plotnikov D, Huang Y, Khawaja AP, Foster PJ, Zhu Z, Guggenheim JA, He M. High Blood Pressure and Intraocular Pressure: A Mendelian Randomization Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022 Jun 1;63(6):29. doi: 10.1167/iovs.63.6.29.

100. Deming Y, Xia J, Cai Y, Lord J, Holmans P, Bertelsen S, Holtzman D, Morris JC, Bales K, Pickering EH, Kauwe J, Goate A, Cruchaga C; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). A potential endophenotype for Alzheimer's disease:

cerebrospinal fluid clusterin. *Neurobiol Aging*. 2016 Jan;37:208.e1-208.e9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.09.009.

101. Ploski R, Wozniak M, Pawlowski R, Monies DM, Branicki W, Kupiec T, Kloosterman A, Dobosz T, Bosch E, Nowak M, Lessig R, Jobling MA, Roewer L, Kayser M. Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum Genet*. 2002 Jun;110(6):592-600. doi: 10.1007/s00439-002-0728-0.

102. Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L, Hohoff C, Illing A, Jonkisz A, Kuzniar P, Lebioda A, Lessig R, Lewicki S, Maciejewska A, Monies DM, Pawłowski R, Poetsch M, Schmid D, Schmidt U, Schneider PM, Stradmann-Bellinghausen B, Szibor R, Wegener R, Wozniak M, Zoledziwska M, Roewer L, Dobosz T, Ploski R. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum Genet*. 2005 Sep;117(5):428-43. doi: 10.1007/s00439-005-1333-9.

103. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Rozmiarek A, Debniak B, Załuga E, Maleszka R, Kładny J, Górski B, Cybulski C, Gronwald J, Kurzawski G, Lubinski J. CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):835-9.

104. Adler G, Łoniewska B, Parczewski M, Kordek A, Ciechanowicz A. Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants. *Pharmacol Rep*. 2009 Sep-Oct;61(5):947-51. doi: 10.1016/s1734-1140(09)70154-9.

105. Maculewicz E, Antkowiak B, Antkowiak O, Mastalerz A, Białek A, Cywińska A, Borecka A, Humińska-Lisowska K, Garbacz A, Lorenz K, Szarska E, Michałowska-Sawczyn M, Dziuda Ł, Ciężczyk P. *IL-6* Polymorphisms Are Not Related to Obesity

Parameters in Physically Active Young Men. *Genes (Basel)*. 2021 Sep 25;12(10):1498. doi: 10.3390/genes12101498.

106. Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3):S233-42. doi: 10.1186/ar565. Epub 2002 May 9. PMID: 12110143;

107. Jones SA, Richards PJ, Scheller J, Rose-John S. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2005 May;25(5):241-253. DOI: 10.1089/jir.2005.25.241.

108. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*. 2003 Jun 27;300(5628):2101-4. doi: 10.1126/science.1083901. Erratum in: *Science*. 2003 Aug 15;301(5635):918.

109. Garbers C, Aparicio-Siegmund S, Rose-John S. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Curr Opin Immunol*. 2015 Jun;34:75-82. doi: 10.1016/j.coi.2015.02.008.

110. Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Apr;24(2):163-73. doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.09.001.

111. Nakajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T, Akira S. Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar 15;90(6):2207-11. doi: 10.1073/pnas.90.6.2207.

112. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004.

doi: 10.1038/nrd1902.

113. Moutabarrik A, Nakanishi I, Ishibashi M. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells. *Scand J Immunol.* 1994 Aug;40(2):181-6. doi: 10.1111/j.1365-3083.1994.tb03448.x.

114. Oberg HH, Wesch D, Grüssel S, Rose-John S, Kabelitz D. Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells. *Int Immunol.* 2006 Apr;18(4):555-63. doi: 10.1093/intimm/dxh396.

115. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt A):1218-27. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.018.

116. Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:1-38. doi: 10.1007/s10254-003-0012-2. Epub 2003 Apr 5. PMID: 12687404.

117. Atsumi T, Ishihara K, Kamimura D, Ikushima H, Ohtani T, Hirota S, Kobayashi H, Park SJ, Saeki Y, Kitamura Y, Hirano T. A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med.* 2002 Oct 7;196(7):979-90. doi: 10.1084/jem.20020619.

118. Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol.* 1993 Feb;23(2):473-80. doi: 10.1002/eji.1830230226

119. Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell.* 1989 Aug 11;58(3):573-81. doi: 10.1016/0092-8674(89)90438-

8.

120. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*. 1988 Aug 12;241(4867):825-8. doi: 10.1126/science.3136546.

121. Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol*. 2006 Dec;195(4):173-83. doi: 10.1007/s00430-006-0019-9.

122. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 May;11(5):613-24. doi: 10.1517/14728222.11.5.613.

123. Li H, Rokavec M, Hermeking H. Soluble IL6R represents a miR-34a target: potential implications for the recently identified IL-6R/STAT3/miR-34a feed-back loop. *Oncotarget*. 2015 Jun 10;6(16):14026-32. doi: 10.18632/oncotarget.4334.

124. Zhuang PY, Wang JD, Tang ZH, Zhou XP, Quan ZW, Liu YB, Shen J. Higher proliferation of peritumoral endothelial cells to IL-6/sIL-6R than tumoral endothelial cells in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2015 Nov 2;15:830. doi: 10.1186/s12885-015-1763-2.

125. Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*. 1992 Mar;4(2):96-100. doi: 10.1016/1043-4666(92)90043-q.

126. Lamas JR, Rodríguez-Rodríguez L, Tornero-Esteban P, Villafuertes E, Hoyas J, Abasolo L, Varadé J, Alvarez-Lafuente R, Urcelay E, Fernández-Gutiérrez B. Alternative splicing and proteolytic rupture contribute to the generation of soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2013 Mar;61(3):720-3. doi: 10.1016/j.cyto.2012.12.025.

- 127.** Dimitrov S, Lange T, Benedict C, Nowell MA, Jones SA, Scheller J, Rose-John S, Born J. Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J.* 2006 Oct;20(12):2174-6. doi: 10.1096/fj.06-5754fje.
- 128.** Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S. Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. *Signal Transduct* 2006, 6:240–59. 10.1002/sita.200600086
- 129.** Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood.* 1993 Aug 15;82(4):1120-6.
- 130.** Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ, Yasukawa K, Nicola NA. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma. *J Biol Chem.* 1998 Apr 24;273(17):10798-805. doi: 10.1074/jbc.273.17.10798.
- 131.** Tanaka M, Kishimura M, Ozaki S, Osakada F, Hashimoto H, Okubo M, Murakami M, Nakao K. Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2000 Jul;106(1):137-44. doi: 10.1172/JCI7479.
- 132.** Vardam TD, Zhou L, Appenheimer MM, Chen Q, Wang WC, Baumann H, Evans SS. Regulation of a lymphocyte-endothelial-IL-6 trans-signaling axis by fever-range thermal stress: hot spot of immune surveillance. *Cytokine.* 2007 Jul;39(1):84-96. doi: 10.1016/j.cyto.2007.07.184.
- 133.** Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett.* 1993 Oct 11;332(1-2):174-8. doi: 10.1016/0014-5793(93)80507-q.

- 134.** Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem.* 2001 Jan;268(1):160-7. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x.
- 135.** Moreno Velásquez I, Golabkesh Z, Källberg H, Leander K, de Faire U, Gigante B. Circulating levels of interleukin 6 soluble receptor and its natural antagonist, sgp130, and the risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2015 Jun;240(2):477-81. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.014.
- 136.** Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Bridges SL Jr, Zhernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; RACI consortium; GARNET consortium; Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 2014 Feb 20;506(7488):376-81. doi: 10.1038/nature12873.
- 137.** Laufer VA, Tiwari HK, Reynolds RJ, Danila MI, Wang J, Edberg JC, Kimberly

RP, Kottyan LC, Harley JB, Mikuls TR, Gregersen PK, Absher DM, Langefeld CD, Arnett DK, Bridges SL Jr. Genetic influences on susceptibility to rheumatoid arthritis in African-Americans. *Hum Mol Genet.* 2019 Mar 1;28(5):858-874. doi: 10.1093/hmg/ddy395.

138. Sasayama D, Hattori K, Ogawa S, Yokota Y, Matsumura R, Teraishi T, Hori H, Ota M, Yoshida S, Kunugi H. Genome-wide quantitative trait loci mapping of the human cerebrospinal fluid proteome. *Hum Mol Genet.* 2017 Jan 1;26(1):44-51. doi: 10.1093/hmg/ddw366.

139. Emilsson V, Ilkov M, Lamb JR, Finkel N, Gudmundsson EF, Pitts R, Hoover H, Gudmundsdottir V, Horman SR, Aspelund T, Shu L, Trifonov V, Sigurdsson S, Manolescu A, Zhu J, Olafsson Ö, Jakobsdottir J, Lesley SA, To J, Zhang J, Harris TB, Launer LJ, Zhang B, Eiriksdottir G, Yang X, Orth AP, Jennings LL, Gudnason V. Co-regulatory networks of human serum proteins link genetics to disease. *Science.* 2018 Aug 24;361(6404):769-773. doi: 10.1126/science.aag1327.

140. Vuckovic D, Bao EL, Akbari P, Lareau CA, Mousas A, Jiang T, Chen MH, Raffield LM, Tardaguila M, Huffman JE, Ritchie SC, Megy K, Ponstingl H, Penkett CJ, Albers PK, Wigdor EM, Sakaue S, Moscati A, Manansala R, Lo KS, Qian H, Akiyama M, Bartz TM, Ben-Shlomo Y, Beswick A, Bork-Jensen J, Bottinger EP, Brody JA, van Rooij FJA, Chitrala KN, Wilson PWF, Choquet H, Danesh J, Di Angelantonio E, Dimou N, Ding J, Elliott P, Esko T, Evans MK, Felix SB, Floyd JS, Broer L, Grarup N, Guo MH, Guo Q, Greinacher A, Haessler J, Hansen T, Howson JMM, Huang W, Jorgenson E, Kacprowski T, Kähönen M, Kamatani Y, Kanai M, Karthikeyan S, Koskeridis F, Lange LA, Lehtimäki T, Linneberg A, Liu Y, Lyytikäinen LP, Manichaikul A, Matsuda K, Mohlke KL, Mononen N, Murakami Y, Nadkarni GN, Nikus K, Pankratz N, Pedersen O, Preuss M, Psaty BM, Raitakari OT, Rich SS,

Rodriguez BAT, Rosen JD, Rotter JI, Schubert P, Spracklen CN, Surendran P, Tang H, Tardif JC, Ghanbari M, Völker U, Völzke H, Watkins NA, Weiss S; VA Million Veteran Program; Cai N, Kundu K, Watt SB, Walter K, Zonderman AB, Cho K, Li Y, Loos RJJ, Knight JC, Georges M, Stegle O, Evangelou E, Okada Y, Roberts DJ, Inouye M, Johnson AD, Auer PL, Astle WJ, Reiner AP, Butterworth AS, Ouwehand WH, Lettre G, Sankaran VG, Soranzo N. The Polygenic and Monogenic Basis of Blood Traits and Diseases. *Cell*. 2020 Sep 3;182(5):1214-1231.e11. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.008.

141. Surapaneni A, Schlosser P, Zhou L, Liu C, Chatterjee N, Arking DE, Dutta D, Coresh J, Rhee EP, Grams ME. Identification of 969 protein quantitative trait loci in an African American population with kidney disease attributed to hypertension. *Kidney Int*. 2022 Nov;102(5):1167-1177. doi: 10.1016/j.kint.2022.07.005. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35870639.

142. Folkersen L, Gustafsson S, Wang Q, Hansen DH, Hedman ÅK, Schork A, Page K, Zernakova DV, Wu Y, Peters J, Eriksson N, Bergen SE, Boutin TS, Bretherick AD, Enroth S, Kalnainen A, Gådin JR, Suur BE, Chen Y, Matic L, Gale JD, Lee J, Zhang W, Quazi A, Ala-Korpela M, Choi SH, Claringbould A, Danesh J, Davey Smith G, de Masi F, Elmståhl S, Engström G, Fauman E, Fernandez C, Franke L, Franks PW, Giedraitis V, Haley C, Hamsten A, Ingason A, Johansson Å, Joshi PK, Lind L, Lindgren CM, Lubitz S, Palmer T, Macdonald-Dunlop E, Magnusson M, Melander O, Michaelsson K, Morris AP, Mägi R, Nagle MW, Nilsson PM, Nilsson J, Orholm Melander M, Polasek O, Prins B, Pålsson E, Qi T, Sjögren M, Sundström J, Surendran P, Vösa U, Werge T, Wernersson R, Westra HJ, Yang J, Zernakova A, Ärnlöv J, Fu J, Smith JG, Esko T, Hayward C, Gyllenstein U, Landen M, Siegbahn A, Wilson JF, Wallentin L, Butterworth AS, Holmes MV, Ingelsson E, Mälarstig A. Genomic and

drug target evaluation of 90 cardiovascular proteins in 30,931 individuals. *Nat Metab.* 2020 Oct;2(10):1135-1148. doi: 10.1038/s42255-020-00287-2.

143. Johansson Å, Rask-Andersen M, Karlsson T, Ek WE. Genome-wide association analysis of 350 000 Caucasians from the UK Biobank identifies novel loci for asthma, hay fever and eczema. *Hum Mol Genet.* 2019 Dec 1;28(23):4022-4041. doi: 10.1093/hmg/ddz175.

144. Temprano-Sagrera G, Sitlani CM, Bone WP, Martin-Bornez M, Voight BF, Morrison AC, Damrauer SM, de Vries PS, Smith NL, Sabater-Lleal M. Multi-phenotype analyses of hemostatic traits with cardiovascular events reveal novel genetic associations. *J Thromb Haemost.* 2022 Jun;20(6):1331-1349. doi: 10.1111/jth.15698.

145. Wojcik GL, Graff M, Nishimura KK, Tao R, Haessler J, Gignoux CR, Highland HM, Patel YM, Sorokin EP, Avery CL, Belbin GM, Bien SA, Cheng I, Cullina S, Hodonsky CJ, Hu Y, Huckins LM, Jeff J, Justice AE, Kocarnik JM, Lim U, Lin BM, Lu Y, Nelson SC, Park SL, Poisner H, Preuss MH, Richard MA, Schurmann C, Setiawan VW, Sockell A, Vahi K, Verbanck M, Vishnu A, Walker RW, Young KL, Zubair N, Acuña-Alonso V, Ambite JL, Barnes KC, Boerwinkle E, Bottinger EP, Bustamante CD, Caberto C, Canizales-Quinteros S, Conomos MP, Deelman E, Do R, Doheny K, Fernández-Rhodes L, Fornage M, Hailu B, Heiss G, Henn BM, Hindorff LA, Jackson RD, Laurie CA, Laurie CC, Li Y, Lin DY, Moreno-Estrada A, Nadkarni G, Norman PJ, Pooler LC, Reiner AP, Romm J, Sabatti C, Sandoval K, Sheng X, Stahl EA, Stram DO, Thornton TA, Wassel CL, Wilkens LR, Winkler CA, Yoneyama S, Buyske S, Haiman CA, Kooperberg C, Le Marchand L, Loos RJF, Matisse TC, North KE, Peters U, Kenny EE, Carlson CS. Genetic analyses of diverse populations improves discovery for complex traits. *Nature.* 2019 Jun;570(7762):514-518. doi: 10.1038/s41586-019-1310-4.

146. Bell S, Rigas AS, Magnusson MK, Ferkingstad E, Allara E, Bjornsdottir G,

Ramond A, Sørensen E, Halldorsson GH, Paul DS, Burgdorf KS, Eggertsson HP, Howson JMM, Thørner LW, Kristmundsdottir S, Astle WJ, Erikstrup C, Sigurdsson JK, Vuckovic D, Dinh KM, Tragante V, Surendran P, Pedersen OB, Vidarsson B, Jiang T, Paarup HM, Onundarson PT, Akbari P, Nielsen KR, Lund SH, Juliusson K, Magnusson MI, Frigge ML, Oddsson A, Olafsson I, Kaptoge S, Hjalgrim H, Runarsson G, Wood AM, Jonsdottir I, Hansen TF, Sigurdardottir O, Stefansson H, Rye D; DBDS Genomic Consortium; Peters JE, Westergaard D, Holm H, Soranzo N, Banasik K, Thorleifsson G, Ouwehand WH, Thorsteinsdottir U, Roberts DJ, Sulem P, Butterworth AS, Gudbjartsson DF, Danesh J, Brunak S, Di Angelantonio E, Ullum H, Stefansson K. A genome-wide meta-analysis yields 46 new loci associating with biomarkers of iron homeostasis. *Commun Biol.* 2021 Feb 3;4(1):156. doi: 10.1038/s42003-020-01575-z.

147. Koskeridis F, Evangelou E, Said S, Boyle JJ, Elliott P, Dehghan A, Tzoulaki I. Pleiotropic genetic architecture and novel loci for C-reactive protein levels. *Nat Commun.* 2022 Nov 14;13(1):6939. doi: 10.1038/s41467-022-34688-6.

148. Paternoster L, Standl M, Waage J, Baurecht H, Hotze M, Strachan DP, Curtin JA, Bønnelykke K, Tian C, Takahashi A, Esparza-Gordillo J, Alves AC, Thyssen JP, den Dekker HT, Ferreira MA, Altmaier E, Sleiman PM, Xiao FL, Gonzalez JR, Marenholz I, Kalb B, Yanes MP, Xu CJ, Carstensen L, Groen-Blokhuis MM, Venturini C, Pennell CE, Barton SJ, Levin AM, Curjuric I, Bustamante M, Kreiner-Møller E, Lockett GA, Bacelis J, Bunyavanich S, Myers RA, Matanovic A, Kumar A, Tung JY, Hirota T, Kubo M, McArdle WL, Henderson AJ, Kemp JP, Zheng J, Smith GD, Rüschenhoff F, Bauerfeind A, Lee-Kirsch MA, Arnold A, Homuth G, Schmidt CO, Mangold E, Cichon S, Keil T, Rodríguez E, Peters A, Franke A, Lieb W, Novak N, Fölster-Holst R, Horikoshi M, Pekkanen J, Sebert S, Husemoen LL, Grarup N, de Jongste JC, Rivadeneira F, Hofman A, Jaddoe VW, Pasmans SG, Elbert NJ, Uitterlinden AG,

Marks GB, Thompson PJ, Matheson MC, Robertson CF; Australian Asthma Genetics Consortium (AAGC); Ried JS, Li J, Zuo XB, Zheng XD, Yin XY, Sun LD, McAleer MA, O'Regan GM, Fahy CM, Campbell LE, Macek M, Kurek M, Hu D, Eng C, Postma DS, Feenstra B, Geller F, Hottenga JJ, Middeldorp CM, Hysi P, Bataille V, Spector T, Tiesler CM, Thiering E, Pahukasahasram B, Yang JJ, Imboden M, Huntsman S, Vilor-Tejedor N, Relton CL, Myhre R, Nystad W, Custovic A, Weiss ST, Meyers DA, Söderhäll C, Melén E, Ober C, Raby BA, Simpson A, Jacobsson B, Holloway JW, Bisgaard H, Sunyer J, Hensch NMP, Williams LK, Godfrey KM, Wang CA, Boomsma DI, Melbye M, Koppelman GH, Jarvis D, McLean WI, Irvine AD, Zhang XJ, Hakonarson H, Gieger C, Burchard EG, Martin NG, Duijts L, Linneberg A, Jarvelin MR, Noethen MM, Lau S, Hübner N, Lee YA, Tamari M, Hinds DA, Glass D, Brown SJ, Heinrich J, Evans DM, Weidinger S. Multi-ancestry genome-wide association study of 21,000 cases and 95,000 controls identifies new risk loci for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 2015 Dec;47(12):1449-1456. doi: 10.1038/ng.3424.

149. Kapelski P, Skibinska M, Maciukiewicz M, Pawlak J, Permoda-Osip A, Twarowska-Hauser J. Family-based association study of interleukin 6 (IL6) and its receptor (IL6R) functional polymorphisms in schizophrenia in the Polish population. *J Neuroimmunol.* 2015 Aug 15;285:62-7. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.09.019.

150. Kapelski P, Skibinska M, Maciukiewicz M, Wilkosc M, Frydecka D, Groszewska A, Narozna B, Dmitrzak-Weglarz M, Czerski P, Pawlak J, Rajewska-Rager A, Leszczynska-Rodziewicz A, Slopian A, Zaremba D, Twarowska-Hauser J. Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL6R, IL10, IL10RA and TGFB1 in schizophrenia in Polish population. *Schizophr Res.* 2015 Dec;169(1-3):1-9. doi: 10.1016/j.schres.2015.10.008.

- 151.** Sokolik R, Iwaszko M, Świerkot J, Wysoczańska B, Korman L, Wiland P, Bogunia-Kubik K. Relationship Between Interleukin-6 -174G/C Genetic Variant and Efficacy of Methotrexate Treatment in Psoriatic Arthritis Patients. *Pharmgenomics Pers Med.* 2021 Jan 28;14:157-166. doi: 10.2147/PGPM.S264555.
- 152.** Lulińska-Kuklik E, Maculewicz E, Moska W, Ficek K, Kaczmarczyk M, Michałowska-Sawczyn M, Humińska-Lisowska K, Buryta M, Chycki J, Ciężczyk P, Żmijewski P, Rzeszutko A, Sawczuk M, Stastny P, Petr M, Maciejewska-Skrendo A. Are *IL1B*, *IL6* and *IL6R* Gene Variants Associated with Anterior Cruciate Ligament Rupture Susceptibility? *J Sports Sci Med.* 2019 Feb 11;18(1):137-145.
- 153.** Drozdziak M, Szlarb N, Kurzawski M. Interleukin-6 level and gene polymorphism in spontaneous miscarriage. *Tissue Antigens.* 2013 Sep;82(3):171-6. doi: 10.1111/tan.12179.